



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**VILMA MENEZES DE JESUS PRADO**

**ISOLAMENTO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS, ESTUDO  
BIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE *Croton  
grewioides* Baill. ATRAVÉS DE FINGERPRINT  
CROMATOGRÁFICO E PCA**

***ISOLATION OF CHEMICAL CONSTITUENTS, BIOLOGICAL  
STUDY AND CHARACTERIZATION OF EXTRACTS FROM  
Croton grewioides Baill. THROUGH CHROMATOGRAPHIC  
FINGERPRINT AND PCA***





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**VILMA MENEZES DE JESUS PRADO**

**ISOLAMENTO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS, ESTUDO  
BIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE *Croton  
grewioides* Baill. ATRAVÉS DE FINGERPRINT  
CROMATOGRÁFICO E PCA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Doutora em Química.

**Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. VALÉRIA REGINA DE SOUZA MORAES**

***ISOLATION OF CHEMICAL CONSTITUENTS, BIOLOGICAL  
STUDY AND CHARACTERIZATION OF EXTRACTS FROM  
Croton grewioides Baill. THROUGH CHROMATOGRAPHIC  
FINGERPRINT AND PCA***

*Thesis presented to the Graduate Program in Chemistry of the Federal University of Sergipe to obtain the title of Doctor in Chemistry.*



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

P896i Prado, Vilma Menezes de Jesus  
Isolamento de constituintes químicos, estudo biológico e caracterização de extratos de *Croton grewoides* Baill. através de fingerprint cromatográfico e PCA / Vilma Menezes de Jesus Prado ; orientadora Valéria Regina de Souza Moraes - São Cristóvão, 2019.

160 f. : il.

Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Plantas medicinais. 2. Plantas da caatinga. 3. Euphorbiaceae. 4. Cromatogramas – Métodos estatísticos. 5. Agentes antineoplásicos. 6. Inibidores de colinesterase. I. Moraes, Valéria Regina de Souza orient. II. Título.

CDU 54:633.88



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
Programa de Pós-Graduação em Química  
PPGQ



### FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de Vilma Menezes de Jesus Prado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 28/02/2019.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valéria Regina de Souza Moraes  
Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Péricles Barreto Alves  
Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Sandro Navickiene  
Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Jair Menezoli (UFC)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sara Maria Thomazzi (DFS/UFS)

## RESUMO

A espécie *Croton grewoides* Baill., popularmente conhecida como “canelinha” ou “canelinha-de-cheiro”, tem sido utilizada para o tratamento da gripe, no combate à tosse, febre e cefaléia, porém o estudo de sua composição fitoquímica é limitado. Um método por cromatografia líquida para diferenciação dos extratos (hidroalcoólico, aquoso e metanólico) de folhas de quatro acessos de *C. grewoides* a partir de duas coletas (inverno e verão) foi desenvolvido. Alguns constituintes químicos do extrato aquoso do acesso 107 (coleta de verão) foram isolados por CLAE semipreparativa, além da avaliação das atividades antitumoral *in vitro* frente as linhagens de células HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia humana) e anticolinesterásica dos extratos e das partições do extrato metanólico. Assim, foram obtidos pela primeira vez os cromatogramas *fingerprint* de todos os extratos, os quais puderam ser comparados com o auxílio de ferramentas quimiométricas. Os resultados mostraram que apenas o perfil químico dos extratos metanólicos dos acessos 101 e 113 foram influenciados pela sazonalidade. As estruturas de três metabólitos isolados foram identificadas por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (uni e bidimensionais), sendo eles a quercetina - 3 - O - [  $\alpha$ - ramnopiranosil- (1-2) -  $\alpha$ - ramnopiranosil- (1-6) –  $\beta$  -glicopiranosídeo], quercetina-3-O-glicosídeo e quercetina-3-O-metil. Quatro partições hexânicas foram consideradas ativas frente a célula HL-60, exibindo valores de 83,75; 84,43; 84,66 e 92,93% de inibição.

**Palavras-chave:** *Croton grewoides* Baill.. Cromatogramas *fingerprint*. Flavonoides. Atividade antitumoral. Atividade anticolinesterásica.

## ABSTRACT

The species *Croton grewioides* Baill., popularly known as "canelinha" or "canelinha-de-odor", has been used for the treatment of influenza, cough, fever and headache, however the study of its phytochemical composition is limited. A method by liquid chromatography for the differentiation of leaf extracts (hydroalcoholic, aqueous and methanolic) of four accessions of *C. grewioides* from two collections (winter and summer) has been developed. Some chemical constituents from aqueous extract of accession 107 (summer collection) were isolated by semi-preparative LC, in addition to the evaluation of *in vitro* activities against the tumor cell lines HepG2 (human hepatocellular carcinoma) and HL-60 (human leukemia) and anticholinesterase of the extracts and the partitions from methanolic extract. Thus, the fingerprint chromatograms of all extracts were obtained for the first time, which could be compared with the aid of chemometric tools. The results showed that only the chemical profile of the methanolic extracts of accessions 101 and 113 were influenced by the seasonality. The structures of three isolated metabolites were identified by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR (uni and bidimensional), namely: quercetin-3-O- [ $\alpha$ -Rhamnopyranosyl- (1-2) - $\alpha$ -Rhamnopyranosyl- (1-6) - $\beta$ -glucopyranoside], quercetin-3-O-glucoside and quercetin-3-O-methyl. Four hexanic partitions were considered active against the HL-60 cell, exhibiting inhibition values of 83.75; 84.43; 84.66 and 92.93%.

**Keywords:** *Croton grewioides* Baill.. Fingerprint chromatograms. Flavonoids. Antitumoral activity. Anticholinesterasic activity.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Plantas Medicinais e Constituintes Químicos.....	1
1.2	Perfil Cromatográfico.....	3
1.3	Análise Quimiométrica.....	5
1.4	Atividades Biológicas.....	7
1.4.1	Atividade Citotóxica.....	7
1.4.2	Atividade Anticolinesterásica.....	9
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1	A Família Euphorbiaceae.....	13
2.2	O Gênero <i>Croton</i> L.....	15
2.2.1	Compostos Isolados do Gênero <i>Croton</i> L e suas Atividades Biológicas.....	16
2.3	Os Flavonoides.....	39
2.3.1	Biossíntese de Flavonoides.....	44
2.4	Espécie <i>Croton grewioides</i> Baill.....	47
3	OBJETIVOS.....	51
3.1	Objetivo Geral.....	51
3.2	Objetivos Específicos.....	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1	Materias e Equipamentos.....	52
4.2	Sistemas Cromatográficos .....	53
4.3	Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear.....	54
4.4	Material Botânico: Coleta das Folhas e Armazenamento.....	54
4.5	Preparação dos Extratos de <i>Croton grewioides</i> .....	56
4.6	Preparo das Amostras Para Análise Cromatográfica.....	57
4.6.1	Extração em Fase Sólida (SPE- Solid Phase Extraction).....	57
4.6.2	Condições Analíticas do Perfil Cromatográfico.....	58
4.7	Análise Quimiométrica.....	58
4.8	Isolamento por Cromatografia Líquida Semi-preparativa de Compostos a Partir do Extrato Aquoso do Acesso 107 (coleta de verão) de <i>C. grewioides</i> e Identificação Estrutural.....	59
4.9	Atividade Citotóxica.....	60

4.10	Atividade Anticolinesterásica.....	61
4.11	Extração Líquido-Líquido dos Extratos Metanólicos de <i>C. grewioides</i> .....	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
5.1	Preparação dos Extratos.....	64
5.2	Desenvolvimento dos Cromatogramas <i>Fingerprint</i> .....	65
5.2.1	Otimização das Condições Cromatográficas de Análise por CLAE dos Extratos de <i>C. grewioides</i> .....	65
5.2.2	Otimização do Procedimento de Pré-tratamento ( <i>Clean-up</i> )....	73
5.2.3	Aplicação da Condição Cromatográfica na Análise de Diferentes Acessos de <i>Croton grewioides</i> .....	76
5.3	Análise Quimiométrica.....	82
5.3.1	Análise de Componentes Principais.....	82
5.4	Isolamento e Identificação dos Constituintes Químicos de <i>C. grewioides</i> .....	89
5.4.1	Isolamento por CLAE-Semipreparativa.....	89
5.4.2	Identificação Estrutural dos Compostos Isolados.....	91
5.5	Estudo da Citotoxicidade em Linhagens de Células Tumorais <i>in vitro</i> .....	112
5.6	Estudo da Atividade de Inibição Enzimática <i>in vitro</i> Frente a Enzima Acetilcolinesterase (AChE).....	116
6	CONCLUSÕES .....	119
7	TRABALHOS EM ANDAMENTO .....	120
8	REFERÊNCIAS .....	121



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Uso de espécies de <i>Croton</i> na medicina tradicional.....	16
<b>Tabela 2 -</b>	Dados dos acessos da espécie <i>C. grewioides</i> .....	55
<b>Tabela 3 -</b>	Rendimento dos extratos das folhas dos acessos de <i>C. grewioides</i> .....	64
<b>Tabela 4 -</b>	Variações analíticas do gradiente exploratório do extrato hidroalcoólico do acesso 126, coleta de inverno.....	66
<b>Tabela 5 -</b>	Condições cromatográficas de análise para obtenção do perfil cromatográfico.....	69
<b>Tabela 6 -</b>	Condições cromatográficas para obtenção do perfil das diferentes frações em SPE.....	74
<b>Tabela 7 -</b>	Variância percentual das componentes principais calculadas para os dados da matriz original centrados na média.....	84
<b>Tabela 8 -</b>	Massas obtidas dos compostos isolados do extrato aquoso acesso 107 (Verão) de <i>C. grewioides</i> .....	89
<b>Tabela 9 -</b>	Deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos do composto 1, comparados com dados da literatura.....	99
<b>Tabela 10 -</b>	Deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos do composto 6, comparados com dados da literatura.....	106
<b>Tabela 11 -</b>	Deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos do composto 7, comparados com dados da literatura.....	111
<b>Tabela 12 -</b>	Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais.....	113
<b>Tabela 13 -</b>	Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais, HepG2 and HL-60, das partições obtidas dos extratos metanólicos.....	115
<b>Tabela 14 -</b>	Atividade inibidora da acetilcolinesterase dos extratos de <i>C. grewioides</i> .....	117

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Compostos isolados de <i>C. penduliflorus</i> e <i>C. heliotropiifolius</i> com atividade acetilcolinesterase.....	12
<b>Figura 2 -</b>	Compostos mais abundantes identificados no óleo essencial de <i>C. lechleri</i> .....	17
<b>Figura 3 -</b>	Compostos isolados de <i>C. campestris</i> .....	18
<b>Figura 4 -</b>	Compostos isolados de <i>C. cajucara</i> .....	18
<b>Figura 5 -</b>	Composto isolado de <i>C. antisiphiliticus</i> .....	20
<b>Figura 6 -</b>	Compostos isolados de <i>C. shiedeana</i> .....	21
<b>Figura 7 -</b>	Compostos isolados de <i>C. zambesicus</i> .....	22
<b>Figura 8 -</b>	Compostos isolados de <i>C. macrostachyus</i> .....	23
<b>Figura 9 -</b>	Compostos isolados de <i>C. euryphyllus</i> .....	23
<b>Figura 10 -</b>	Compostos isolados de <i>C. tigilium</i> .....	25
<b>Figura 11 -</b>	Compostos isolados de <i>C. tigilium</i> .....	27
<b>Figura 12 -</b>	Compostos isolados de <i>C. echinocarpus</i> .....	28
<b>Figura 13 -</b>	Compostos isolados de <i>C. yanhuai</i> .....	28
<b>Figura 14 -</b>	Compostos isolados de <i>C. crassifolius</i> .....	29
<b>Figura 15 -</b>	Compostos isolados de <i>C. laui</i> .....	31
<b>Figura 16 -</b>	Compostos isolados de <i>C. crassifolius</i> .....	33
<b>Figura 17 -</b>	Compostos isolados de <i>C. crassifolius</i> .....	35
<b>Figura 18 -</b>	Compostos isolados de <i>C. sellowii</i> .....	36
<b>Figura 19 -</b>	Compostos isolados de <i>C. pedicellatus</i> .....	37
<b>Figura 20 -</b>	Compostos isolados de <i>C. muscicarpa</i> .....	38
<b>Figura 21 -</b>	Estrutura fundamental dos flavonoides e de suas principais sub-classes.....	40
<b>Figura 22 -</b>	Compostos com atividade citotóxica.....	41
<b>Figura 23 -</b>	Compostos isolados da <i>Pseudarthria hookeri</i> com atividade citotóxica.....	42
<b>Figura 24 -</b>	Compostos isolados de propólis com atividade citotóxica..	42
<b>Figura 25 -</b>	Compostos isolados de <i>Erucaria hispanica</i> com atividade citotóxica.....	43

<b>Figura 26 -</b>	Compostos identificados da <i>Achyrocline satureioides</i> com atividade citotóxica.....	44
<b>Figura 27 -</b>	Biossíntese de Flavonoides.....	45
<b>Figura 28 -</b>	Principal composto encontrado no óleo essencial de <i>C. grewioides</i> .....	48
<b>Figura 29 -</b>	Compostos isolados de <i>C. grewioides</i> .....	49
<b>Figura 30 -</b>	Foto da espécie <i>C. grewioides</i> Baill. [Inverno <b>(A)</b> e Verão <b>(B)</b> ].....	55
<b>Figura 31 -</b>	Folhas secas dos quatro acessos de <i>C. grewioides</i> das duas coletas (inverno e verão).....	56
<b>Figura 32 -</b>	Cromatogramas obtidos das condições descritas na tabela 4 do extrato hidroalcoólico do acesso 126 coleta de inverno .....	67
<b>Figura 33 -</b>	Cromatogramas dos testes de otimização do extrato hidroalcoólico do acesso 126 (inverno) descritos na Tabela 5.....	70
<b>Figura 34 -</b>	Cromatogramas obtidos do extrato hidroalcoólico do acesso 126 (inverno) a partir da condição 3 utilizando quatro temperaturas diferentes (Tabela 4).....	72
<b>Figura 35 -</b>	Cromatogramas obtidos na condição 6 (Tabela 5) variando os comprimentos de onda do detector.....	73
<b>Figura 36 -</b>	Cromatogramas obtidos das frações dos testes 1 e 2 (Tabela 6).....	75
<b>Figura 37 -</b>	Cromatogramas de quatro acessos dos três tipos de extração e das duas coletas.....	76
<b>Figura 38 -</b>	Cromatogramas comparando cada acesso nas diferentes extrações (decocção - preto, hidroalcoólico - vermelho e metanólico - azul).....	77
<b>Figura 39 -</b>	Cromatogramas <i>fingerprint</i> ( $\lambda=320$ nm) dos extratos dos quatro acessos de <i>C. grewioides</i> em quadruplicata.....	79
<b>Figura 40 -</b>	Gráfico de pré-processamento dos dados centrado na média.....	83
<b>Figura 41 -</b>	Variância explicada (%) para cada componente principal..	84

<b>Figura 42 -</b>	Gráfico de escores (PC1 <i>versus</i> PC2) das amostras de <i>C. grewioides</i> .....	85
<b>Figura 43 -</b>	<i>Loadings</i> PC1 <i>versus</i> PC2.....	87
<b>Figura 44 -</b>	Cromatogramas em 320nm, do extrato aquoso acesso 107 (verão) e de seus respectivos compostos isolados juntamente com os seus espectros de absorção no UV.....	90
<b>Figura 45 -</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 1 (A, total) e suas expansões: (B) entre $\delta_{\text{H}}$ 7,8 e 5,8; (C) entre $\delta_{\text{H}}$ 5,8 e 4,4; (D) entre $\delta_{\text{H}}$ 4,1 e 3,2; (E) entre $\delta_{\text{H}}$ 2,7 e 0,7.....	92
<b>Figura 46 -</b>	Mapa de contorno COSY (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 1.....	94
<b>Figura 47 -</b>	Mapa de correlação HSQC do Composto 1 (A, total) e sua expansão: (B) entre $\delta_{\text{H}}$ 4,4 e 3,0 e $\delta_{\text{C}}$ 80 e 55.....	94
<b>Figura 48 -</b>	Mapa de correlação HMBC do Composto 1 (A, total) e sua expansão: (B) entre $\delta_{\text{H}}$ 5,9 e 4,3 e $\delta_{\text{C}}$ 140 e 60.....	95
<b>Figura 49 -</b>	Estrutura da Quercetina - 3 - O - [ $\alpha$ - ramnopiranosil - (1-2) - $\alpha$ - ramnopiranosil - (1-6) - $\beta$ - glicopiranosídeo].....	96
<b>Figura 50 -</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 1 (A, total) e suas expansões: (B) entre $\delta_{\text{C}}$ 190 e 130; (C) entre $\delta_{\text{C}}$ 130 e 90; (D) entre $\delta_{\text{C}}$ 79 e 67; (E) entre $\delta_{\text{C}}$ 30 e 10.....	97
<b>Figura 51 -</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 6 (A, total) e suas expansões: (B) entre $\delta_{\text{H}}$ 7,8 e 5,8; (C) entre $\delta_{\text{H}}$ 5,8 e 4,4; e (D) entre $\delta_{\text{H}}$ 4,1 e 3,2.....	101
<b>Figura 52 -</b>	Mapa de contorno COSY (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 6.....	102
<b>Figura 53 -</b>	Mapa de correlação HSQC do Composto 6 entre $\delta_{\text{H}}$ 4,1 e 3,0 e entre $\delta_{\text{C}}$ 80 e 60.....	102
<b>Figura 54 -</b>	Mapa de correlação HMBC do Composto 6 (A, total) e sua expansão: (B) entre $\delta_{\text{H}}$ 5,7 e 4,8 e entre $\delta_{\text{C}}$ 150 e 60...	103
<b>Figura 55 -</b>	Estrutura da Quercetina-3-O-glicosídeo.....	104

<b>Figura 56 -</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 6 (A, total) e suas expansões: (B) entre $\delta_{\text{C}}$ 183 e 140; (C) entre $\delta_{\text{C}}$ 140 e 90; (D) entre $\delta_{\text{C}}$ 80 e 60.....	104
<b>Figura 57 -</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 7 (A, total) e suas expansões: (B) entre $\delta_{\text{H}}$ 7,8 e 5,9; e (C) entre $\delta_{\text{H}}$ 4,1 e 3,0.....	107
<b>Figura 58 -</b>	Mapa de contorno COSY (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 7.....	108
<b>Figura 59 -</b>	Mapa de correlação HSQC do Composto 7.....	108
<b>Figura 60 -</b>	Mapa de correlação HMBC do Composto 7 (A, total) e sua expansão: (B) entre $\delta_{\text{H}}$ 4,5 e 3,4 e $\delta_{\text{C}}$ 190 e 40.....	109
<b>Figura 61 -</b>	Estrutura da Quercetina-3-O-metil.....	109
<b>Figura 62 -</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (150 MHz, $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 7 (A, total) e suas expansões: (B) entre $\delta_{\text{C}}$ 182 e 140; (C) entre $\delta_{\text{C}}$ 140 e 60.....	110

### **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

*A Deus, presença constante em minha vida, pela vida, por todas as possibilidades, oportunidades e por colocar pessoas especiais em meu caminho.*

*Ao meu Esposo, Eguinaldo por todo apoio e compreensão.*

*Aos meus pais Antônio e Vivalda e minhas irmãs, Ana Maria, Aline e Beatriz, por estarem sempre ao meu lado, me mostrando que tudo é possível. Vocês são minha virtude.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Sergipe (UFS) através do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) e do Departamento de Química (DQI) pela oportunidade para realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Regina de Souza Moraes, pela oportunidade em compartilhar de seu conhecimento, confiança, convivência e apoio.

Aos órgãos de fomento à pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), FAPITEC/SE, e CNPq.

Ao Prof.<sup>o</sup> Dr. Arie Fitzgerald Blank pelo fornecimento das folhas da espécie *Croton grewioides* Baill.

Ao Prof.<sup>o</sup> Dr. Paulo César de Lima Nogueira pela colaboração, contribuições e ensinamentos no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof.<sup>o</sup> Dr. Sandro Navickiene, pela disponibilização de equipamentos e materiais do seu laboratório para execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho, da Universidade Federal de São Carlos, pela realização das análises quimiométricas.

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, da Universidade Federal de São Carlos, pela realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Dr. Daniel Pereira Bezerra, da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz – Bahia, juntamente com a Dra. Milena Botelho Pereira Soares e seus alunos Valdenizia Rodrigues Silva e Luciano de Souza Santos pela análise de citotoxicidade *in vitro*.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Lúcia Cardoso, Dr<sup>a</sup>. Claudia Seidl e Dr<sup>a</sup>. Adriana Ferreira Lopes Vilela, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-SP, pela realização dos ensaios anticolinesterásicos.

Aos Professores Doutores Jair Mafezoli, Péricles Barreto Alves, Sandro Navickiene e Sara Maria Thomazzi, membros da banca examinadora, pela atenção e sugestões a este trabalho.

Aos meus grandes companheiros de laboratório, que tornaram minha rotina muito mais agradável e cheia de boas risadas, Cristivane, Graciele, Renata, Matheus, Pedro e em especial Raphael e Júlio pela grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos Edna e Nailton, que foram grandes incentivadores para que eu ingressasse no doutorado.

Aos meus amigos, Larissa, Adilson, Givanilton, Cristiane e Silvânio pelas conversas e companheirismo.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Química (DQI), que direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A 549 - Linhagem celular do Carcinoma de Pulmão Humano
- ACh - Acetilcolina
- AChE - Enzima Acetilcolinesterase
- AChE<sub>eel</sub> - Enzima Acetilcolinesterase isoforma de peixe elétrico
- ACN - Acetonitrila
- ATP - Trifosfato de adenosina
- C<sub>18</sub> - Octadecilsilano
- Cl<sub>50</sub> - Concentração inibitória média
- CL - Cromatografia Líquida
- CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- COSY - Correlation Spectroscopy
- CT26.WT - Linhagem celular do Carcinoma Cólon murino
- d* - Dubleto
- DAD - Detector de Arranjos de Diodos
- dd* - Duplo Dubleto
- DI - Decocção (extrato aquoso) coleta de inverno
- DV - Decocção (extrato aquoso) coleta de verão
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DOX - Doxorrubicina
- EPSP - Ácido 5-enol-piruvil-chiquímico 3-fosfato (do inglês, 3-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate)
- Gli - Glicose
- HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation
- HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence
- HCA - Análise de Agrupamentos Hierárquicos (do inglês, *Hierarchical Clustering Analysis*)
- HCT-8 - Linhagem celular do Carcinoma de cólon humano
- HI - Extrato Hidroalcolico coleta de inverno
- HV - Extrato Hidroalcolico coleta de verão
- HepG2 - Linhagem celular do Carcinoma Hepatocelular Humano
- HL-60 - Linhagem celular da Leucemia Promielocítica Humana

- ICER - Reator Imobilizado de Enzimas Capilares (do inglês, *Immobilized Capillary Enzyme Reactor*)
- J* - Constante de Acoplamento
- K 562 - Linhagem celular da Leucemia Mielóide Aguda Humana
- K-NN - K-ésimo vizinho mais próximo (do inglês, *K-Nearest Neighbor*)
- LDA - Análise discriminante linear (do inglês, *Linear Discriminant Analysis*)
- LPS - Lipopolissacarídeo
- MDA-MB-435- Linhagem celular do Melanoma Humana
- m* - Multiplete
- MI - Extrato Metanólico coleta de inverno
- MV - Extrato Metanólico coleta de verão
- MeOH - Metanol
- MeOH-*d*<sub>4</sub> - Metanol deuterado
- m/z* - Relação massa/carga
- PAL - Fenilalanina amônia-liase (FAL) (do inglês, *Phenylalanine ammonia lyase*)
- PCA - Análise de Componentes Principais (do inglês, *Principal Component Analysis*)
- PEP - Fosfoenolpiruvato (do inglês, *Phosphoenolpyruvate*)
- PLP - Piridoxina 5-fosfato (do inglês, *Pyridoxal phosphate*)
- PLS - Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, *Partial Least Squares*)
- RMN - Ressonância Magnética Nuclear
- RPMI 1640 - Meio de Cultura Celular
- s* - Singleto
- SIMCA - Modelagem Independente para analogia de Classes (do inglês, *Soft-Independent Modeling of Class Analogy*)
- SF-295 - Linhagem celular do Glioblastoma Humana
- SPE - Extração em fase sólida (do inglês, *Solid Phase Extraction*)
- t* - Tripleto
- tl* - Tripleto Largo
- UV-Vis- Radiação Ultravioleta na região visível

$\Delta\%B/\text{min}$  - Variação da porcentagem do solvente B (orgânico) por minuto  
(inclinação do gradiente)

$\delta$  - Deslocamento Químico, em ppm

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Plantas Medicinais e Constituintes Químicos**

A base da medicina tradicional resulta do proveito dos recursos naturais pela humanidade ao longo do tempo para suas necessidades básicas, como a produção de alimentos, abrigos, vestuários, meios de transporte, medicamentos, entre outros [1, 2].

A partir do conhecimento e da utilização de plantas medicinais na medicina popular, muitos fitoterápicos estão sendo desenvolvidos, devido a grande presença de moléculas bioativas, as quais têm grande importância na produção de novos produtos farmacêuticos. Cerca de 25% dos medicamentos utilizados nos países desenvolvidos são produzidos direta ou indiretamente a partir de plantas [3].

Nos países em desenvolvimento, devido às limitações dos serviços de saúde, as plantas medicinais representam a única opção de tratamento acessível, uma vez que nestes países cerca de 65-80% da população depende exclusivamente de produtos naturais para cuidados básicos de saúde sendo, por exemplo, 80% da população na África, 71% no Chile e 40% na Colômbia [4].

A partir da segunda metade do século XX, a necessidade da população por novos fármacos provocou um notável crescimento de estudos sobre a química e farmacologia de plantas medicinais, o qual ocasionou aumento da preocupação com a degradação ambiental e a necessidade de garantir o uso sustentável dos recursos naturais [5].

O Brasil possui uma enorme e rica diversidade étnica e cultural. Além disso, por ser o país com maior variedade biológica do mundo, tem o potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas com resultados terapêuticos favoráveis e um conhecimento empírico relevante associado ao uso de plantas medicinais [6]. O conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais e seus derivados que tem valor regional se encontra em mercados ao ar livre,

farmácias e em lojas de produtos naturais, os quais são muitas vezes a principal forma de acesso da população urbana a estes fitoterápicos [7].

Os efeitos de plantas medicinais podem ou não ser altamente eficazes para fins terapêuticos, pois há falta do conhecimento do seu valor científico pela população em geral. Isso porque as plantas contêm misturas de substâncias químicas que podem agir individualmente de forma a melhorar a saúde. Uma única planta pode, por exemplo, conter compostos fenólicos que podem atuar como antioxidantes, antibacterianos e antifúngicos (antibióticos naturais) e alcalóides que melhoram o humor e propiciam uma sensação de bem-estar [1].

A caatinga é um bioma típico do nordeste brasileiro, fonte de muitos recursos naturais e com grande diversidade cultural e biológica, pouco estudado. Muitas espécies de plantas dessa região são utilizadas para a produção de produtos fitoterápicos, ocasionando uma grande necessidade de estudar a biodiversidade desse bioma, além de desenvolver estratégias de conservação e uso sustentável [5]. Alguns metabólitos secundários presentes nas plantas podem não ser obrigatoriamente um constituinte comumente encontrado quando elas estão saudáveis. A explicação para este fato é que estes compostos, denominados fitoalexinas, tenham sido sintetizados como parte do sistema de defesa da planta em resposta ao ataque de bactérias e fungos [1].

No Brasil, após uma avaliação científica da ação terapêutica e propriedades toxicológicas, as plantas medicinais e seus derivados podem ser empregados pela população em suas necessidades básicas de saúde. Os órgãos responsáveis pela investigação na produção de novos fármacos têm a responsabilidade de garantir o uso seguro de drogas naturais e seus derivados. O processo de cultivo, informações como aspectos de sazonalidade, características do clima (índice pluviométrico, temperatura), altitude e solo devem ser consideradas com o objetivo de evitar variações e perda do efeito terapêutico, pois os constituintes químicos presentes nas plantas sofrem influência direta destes fatores externos, alterando a taxa de produção dos metabólitos secundários [3, 8].

Um dos fatores de maior importância é o período em que a planta é coletada, pois é observado variações sazonais no conteúdo de praticamente

todas as classes de metabólitos secundários, como terpenoides, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, saponinas, alcaloides, taninos, entre outros, além de variações no conteúdo de óleo essencial extraído [8].

Assim, estudos de melhoramentos genéticos devem ser desenvolvidos e aplicados em plantas medicinais a fim de obter materiais uniformes e de alta qualidade. Várias etapas são incluídas para o controle de qualidade e padronização de fitoterápicos, no entanto, a procedência e a qualidade da matéria-prima têm um papel primordial na obtenção de produtos de composição estável e propriedades terapêuticas reprodutíveis [8].

Novos medicamentos, como agentes terapêuticos para o tratamento do câncer, bactérias e vírus resistentes e transtornos imunossupressores estão sendo desenvolvidos a partir de produtos naturais. As propriedades etnofarmacológica, quimiosistemática e ecológica podem ser investigadas tendo como base a composição química das plantas e de outros organismos vivos. Porém, muitas dessas fontes permanecem em grande parte desconhecidas [9].

Para investigação desses novos medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais está sendo bastante utilizada a técnica de *fingerprint* cromatográfico, uma ferramenta para o controle de qualidade de muitos fitoterápicos comercializados atualmente [10, 11].

## 1.2 Perfil Cromatográfico

O *fingerprint* cromatográfico (impressão digital cromatográfica) de uma planta caracteriza o perfil metabólito que representa a complexidade química de uma amostra vegetal, podendo ser obtida também por técnicas espectroscópicas e eletroforéticas [10]. A metodologia baseia-se na obtenção do cromatograma, sem ter a necessidade de identificar ou quantificar cada composto presente [12].

Este perfil cromatográfico pode ser utilizado para definir um padrão de extratos de ervas medicinais que contenham determinados tipos de constituintes químicos e que apresentam certos tipos de atividades

farmacológicas [13]. Desta forma ele descreve a complexidade química de amostras de plantas pela separação cromatográfica de vários constituintes em extratos padronizados, que contêm marcadores químicos relacionados às propriedades farmacológicas atribuídas para as espécies. Além disso, ele também avalia a variabilidade química em extratos de plantas medicinais [11], sendo, inclusive, aprovado o seu uso pela Organização Mundial de Saúde como um método para o controle de qualidade de medicamentos à base de plantas [10, 14].

Considerando que os medicamentos à base de plantas medicinais apresentam matrizes complexas, o *fingerprint* cromatográfico é amplamente utilizado na identificação, autenticação, caracterização e classificação desses medicamentos. Assim sendo, se torna um método promissor na análise qualitativa e quantitativa de produtos naturais complexos, os quais fornecem um perfil detalhado dos componentes com ação biológica e farmacêutica na planta [12, 15].

Um fitoterápico pode apresentar variações nas concentrações de seus constituintes químicos de um lote para outro. Isso acontece devido a vários fatores, como por exemplo: as diferenças nas espécies botânicas, os quimiotipos usados e a parte anatômica da planta utilizada (semente, flor, raiz, folha etc). Além disso, deve-se levar em consideração as condições de armazenamento, irradiação solar, umidade, tipo de solo, tempo de colheita que o material vegetal está sendo submetido. Isso pode acarretar em diferenças significativas nas atividades farmacológicas que cada lote pode apresentar [14].

Para garantir as propriedades químicas do fitoterápico é necessário o desenvolvimento de técnicas analíticas que assegurem a autenticidade da matéria prima vegetal, tendo em vista o crescente uso de ervas medicinais pela população. Neste caso, a cromatografia líquida é uma das técnicas mais utilizadas para este propósito [14].

No entanto, o uso desta técnica isoladamente torna-se limitada para avaliar as informações sobre as amostras. Assim, têm sido propostas ferramentas quimiométricas adequadas para auxiliar na extração de um máximo de informações úteis dos cromatogramas *fingerprints*. Além disso, elas também podem ajudar a resolver alguns inconvenientes que podem surgir em uma análise cromatográfica, como a baixa relação sinal/ruído, picos

assimétricos e variação no tempo de retenção, além da complexidade das amostras, o que pode tornar sua análise por técnicas convencionais muito difícil e demorada [15].

### 1.3 Análise Quimiométrica

Na química aplicada, o uso da quimiometria foi disseminado e reconhecido desde 1960 [16]. A Sociedade Internacional de Quimiometria (SIQ) define quimiometria como sendo a ciência que relaciona medidas feitas em um sistema químico pela utilização de métodos matemáticos ou estatísticos, sendo a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) um dos principais métodos estatísticos, devido a redução da dimensionalidade dos dados [17-19].

Com o avanço da tecnologia computacional, a quimiometria tornou-se uma ferramenta líder entre as comunidades científicas com resultados de análise mais rápidos. Assim, como um ramo da química analítica, é a melhor maneira de maximizar a qualidade da informação acessível a partir das amostras, além de contribuir para o desenvolvimento de métodos analíticos mais ecológicos [18, 20].

Dentre as diferentes metodologias relacionadas a quimiometria é possível citar: *design* de experimentos, que define as melhores condições operacionais; pré-tratamento de dados, que envolve dados condicionado para análise adequada, e análise de dados multivariada, que compreende metodologias qualitativas e quantitativas. Os principais objetivos da análise qualitativa são detectar grupos de objetos que tenham características semelhantes, visualizar e caracterizar tendências ocultas entre grupos e, finalmente, atribuir novas amostras a um grupo conhecido [20].

Os métodos de análise multivariada de dados podem ser classificados em supervisionados ou não supervisionados. Os métodos não supervisionados têm por objetivo identificar agrupamentos entre amostras sem qualquer conhecimento prévio sobre a natureza dessas amostras. Em contraste, os métodos supervisionados exigem o conhecimento inicial sobre a natureza dessas amostras para a formação de classes entre elas. Entre os métodos não



supervisionados destaca-se a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA, do inglês, *Hierarchical Clustering Analysis*). Entre os supervisionados, destaca-se a regra dos vizinhos mais próximos (K-NN, do inglês, *K-Nearest Neighbor*), a modelagem independente para analogia de classes (SIMCA, do inglês, *Soft-Independent Modeling of Class Analogy*), a análise discriminante linear (LDA, do inglês, *Linear Discriminant Analysis*), e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês, *Partial Least Squares*) [21].

A PCA é uma ferramenta quimiométrica de múltiplas variáveis que visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original, sendo utilizado principalmente como uma metodologia de exibição em análise exploratória [22]. É o método mais utilizado para lidar com dados multivariados sem conhecimento prévio sobre as amostras estudadas. Envolve a redução da dimensão dos dados originais a partir da decomposição de uma matriz  $X$ , geralmente após centralizar a média dos dados. A utilização da PCA explica a correlação entre um número de variáveis em termos de um número menor de fatores subjacentes denominados componentes principais (do inglês, PC: *Principal Component*) sem perder muita informação. Este método permite a exploração de dados por projeção de amostras pela análise combinada dos gráficos de *scores* e *loadings* que mostram informações sobre as amostras e variáveis, respectivamente [20, 23-25].

A primeira componente principal (PC1) é a combinação linear que conta com a variação máxima de dados e fornece uma aproximação unidimensional a eles, representando o máximo da variância total. A segunda (PC2) é ortogonal a primeira e fica na direção da maior variação restante, e assim por diante, até que a variância total seja contabilizada. Melhores aproximações são obtidas usando mais PCs, em que cada PC sucessiva não é correlacionada com as PCs anteriores. As componentes principais contêm diferentes fontes de informação, uma vez que cada uma define uma direção de distribuição dos dados [16, 21, 26, 27].

A redução de dados é obtida apenas mantendo as primeiras PCs, que contêm a maioria das informações dos dados. Matematicamente, é possível ilustrar a redução da dimensionalidade do conjunto de dados por PCA seguindo a equação:

$$X = PA^T + \epsilon$$

Onde **X** é a matriz das variáveis originais, *scores* (**P**) e *loadings* (**A**<sup>T</sup>, onde T é o operador de transposição da matriz), **ε** é a matriz de erro. Os *loadings* descrevem um novo conjunto de eixos ortogonais, fornecendo os pesos das variáveis originais nas novas PCs. Os *scores* representam as coordenadas das amostras no espaço dos *loadings* [26, 27].

A aplicação das componentes principais para classificar os objetos (amostras) consiste na construção de gráficos bidimensionais ou tridimensionais, formados por essas componentes, as quais explicam a maior quantidade de variação. Além disso, fornecem uma enorme carga de informações na interpretação e na classificação dos objetos [25]. Assim os objetos (amostras) semelhantes tendem a se agrupar nos gráficos de *scores*, enquanto os objetos diferentes tendem a se separar [21].

A centralização da média é geralmente usada na PCA para ter as pontuações (*scores*) resultantes expressando o desvio de cada amostra do espectro médio, ou seja, para remover informações consistentes em todas as amostras do modelo. Já os *loadings* indicam as características espectroscópicas mais relevantes para essa variabilidade [27].

## 1.4 Atividades Biológicas

### 1.4.1 Atividade Citotóxica

O câncer é um dos grandes problemas de saúde pública e uma das principais causas de morte no mundo, sendo que nos homens há predominância dos cânceres de próstata e de pulmão; enquanto que nas mulheres predomina o de mama e o de colo de útero [28].

No entanto, a procura por terapias e tratamentos medicamentosos tem se mostrado modesto devido à toxicidade medular empregada pelos agentes antineoplásicos clássicos, além do nível de agressividade da doença [28, 29].

Com o intuito de identificar constituintes ativos que se mostrem mais úteis no controle de tumores humanos, a procura por substâncias

biologicamente ativas em plantas utilizadas na medicina tradicional é objeto de estudo em vários laboratórios [30].

Desde 1950 o uso de produtos naturais contra o câncer foi reconhecido pelo Instituto Nacional do Câncer nos EUA. Alguns dos medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento contra o câncer, como o taxol, a vimblastina e a vincristina, são metabólitos secundários encontrados em plantas [31].

Com a finalidade de determinar o potencial de novas substâncias e produtos que possam causar danos à saúde humana, uma investigação da toxicidade de um material deve ser realizada. Assim, são realizados testes que analisam a ação tóxica, além da toxicocinética e a relação dose resposta para classificar as substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade [32, 33].

Informações auxiliares sobre o estudo das neoplasias podem ser obtidas pelo estudo da atividade citotóxica, a qual possibilita estabelecer uma relação entre os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*. As culturas de células humanas e animais são fundamentais aos estudos *in vitro* da citotoxicidade de substâncias naturais ou sintéticas [34].

Para avaliar o efeito tóxico de substâncias a diversos tecidos são realizados ensaios de citotoxicidade celular, os quais são usados para examinar o dano de agentes químicos a órgãos específicos. Muitos testes com análise de agentes tóxicos usam animais em seus laboratórios, o que vem estimulando a busca por métodos *in vitro* para um *screening* inicial, diminuindo a realização de testes em animais com amostras que não apresentam inibição significativa [35].

O desenvolvimento de ensaios quimiossensíveis *in vitro* vem sendo realizado para testar agentes anticancerígenos por meio das pesquisas terapêuticas que auxiliam nesse avanço. Os metabólitos secundários têm sido a origem de novas atividades antiproliferativas farmacológicas, mas os mecanismos de ação destes compostos ainda vêm sendo elucidados [36].

Sabendo que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos, a determinação da atividade citotóxica de um fitoterápico constitui uma medida prioritária. Devido ao fácil acesso e a grande disponibilidade, os glóbulos vermelhos são células bastante utilizadas para

estudos de citotoxicidade *in vitro*, possibilitando a avaliação do efeito tóxico ou protetor de princípios ativos sobre a membrana celular [37].

Muitos estudos têm mostrado o potencial terapêutico diversificado de muitas plantas e seus óleos essenciais, as quais representam uma rica fonte de substâncias que podem ser úteis na prevenção e tratamento do câncer. As técnicas envolvidas incluem efeitos antioxidantes, antimutagênicos e antiproliferativos, ou melhoramento da função imunológica, induzindo enzimas, aumentando a desintoxicação e modulando a resistência a numerosos fármacos [38].

Várias espécies do gênero *Croton* contêm compostos detectados em extratos e óleos essenciais, que apresentam atividade antitumoral, como, por exemplo, o óleo essencial das folhas de *C. regelianus* e de *C. flavens*, bem como dos constituintes isolados do óleo essencial das folhas de *C. flavens*, o  $\alpha$ -cadinol,  $\beta$ -elemeno e  $\alpha$ -humuleno [9, 39].

Estudos *in vivo* e *in vitro* descrevem que os compostos ascaridol, isolado de *C. regelianus* e isoguanosina, isolada de *C. tiglium*, demonstraram atividade antitumoral sobre o modelo sarcoma murino 180 [9, 40].

Savietto *et al.* [31] mostraram em seu trabalho a atividade antiproliferativa, frente a dez linhagens celulares de câncer humano, dos extratos metanólicos das folhas e cascas de quatro espécies de *Croton*: *C. dichrous* Müll. Arg., *C. erythroxyloides* Baill., *C. myrianthus* Müll. Arg. e *C. splendidus* Mart.. O extrato das folhas de *C. erythroxyloides* apresentou importante atividade contra as linhagens celulares PC-3 (próstata) e OVCAR-3 (ovário). Os autores sugerem que esta atividade esteja associada a concentração de flavonoides tilirosídeos, apesar da existência de outros flavonoides nos extratos.

#### 1.4.2 Atividade Anticolinesterásica

A doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência, a qual é caracterizada pelo início gradual de declínio do maior funcionamento cognitivo, ou seja, é uma relação progressiva com a idade caracterizada pela degeneração da função neurológica. Esta degeneração ocorre devido à

redução de níveis do neurotransmissor acetilcolina nos cérebros dos idosos à medida que a doença progride, resultando em perda da capacidade cognitiva [41].

Na população com Alzheimer são observados deficiência cognitiva e funcional, os quais estão relacionados com a degeneração do sistema colinérgico devido principalmente a diminuição dos níveis plasmáticos de acetilcolina. Uma melhora significativa dos sintomas cognitivos, comportamentais e funcionais relacionados às demências hipocolinérgicas são notados quando tratados com inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE). Esses inibidores aumentam os níveis de acetilcolina (ACh) presentes nas sinapses entre neurônios colinérgicos. Esses neurônios estão relacionados com ações exercidas pela ACh como, alerta, controle motor, aprendizado e a memória, as quais são prejudicadas quando há deficiências na secreção desse neurotransmissor [42].

Os inibidores de AChE alteram a função colinérgica central ao inibir as enzimas que degradam a acetilcolina (enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase), ampliando a capacidade da acetilcolina de estimular os receptores cerebrais, nicotínicos e muscarínicos. Os portadores da doença de Alzheimer têm níveis reduzidos da acetilcolina, que é um neurotransmissor que intervém nos processos da memória. Dados estatísticos mostram que aproximadamente 5 a 10% da população com idade superior a 65 anos e 20 a 40% daqueles com faixa etária superior a 85 anos são portadores de Alzheimer [43], a qual se caracteriza por ser uma doença neurodegenerativa, progressiva e que afeta principalmente a população idosa.

A inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) é uma maneira eficaz no tratamento desta doença, sendo considerada a forma mais eficiente para seu controle. Apenas os sintomas podem ser amenizados, pois suas causas ainda não foram determinadas [44]. Alguns inibidores de AChE como a tacrina, denopetil, rivatigmina e galantamina, que mantêm altos níveis de neurotransmissor acetilcolina, são conhecidos por ter limitações, como meia vida curta ou efeitos secundários como hepatotoxicidade. Dentre estas, a galantamina é um inibidor da AChE de longa duração, seletivo, reversível e competitivo, considerado muito eficaz no tratamento da doença [45-47].

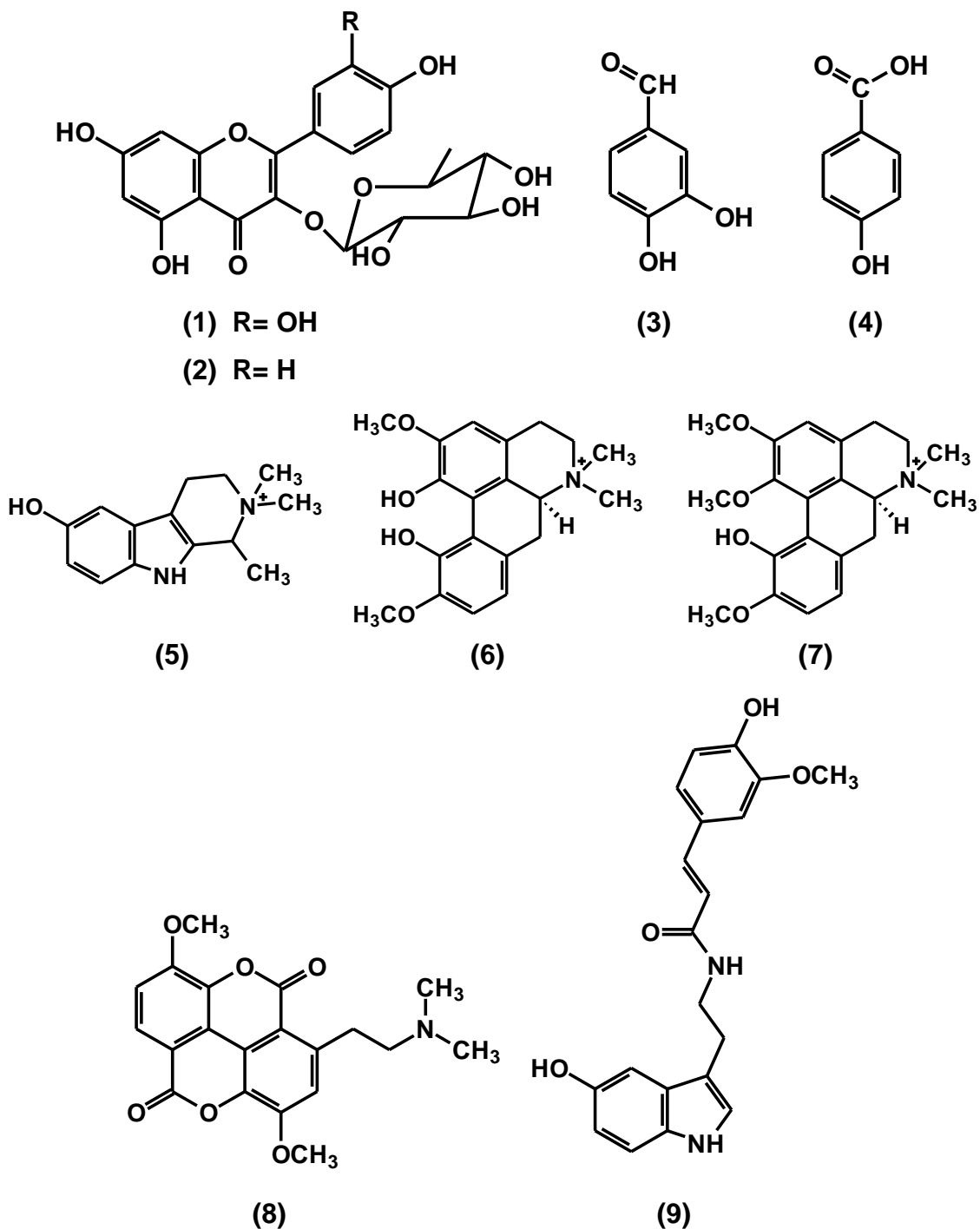
A galantamina apesar de ser a melhor forma de controlar a doença disponível no momento, é uma substância que apresenta diversos efeitos colaterais, além do alto custo. O mecanismo de ação dessas drogas é manter altos os níveis de ACh nos receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos no sistema nervoso central, determinando assim benefícios sobre as funções cognitivas e outras áreas afetadas pela doença. Assim, a busca por novos fármacos com atividade frente à acetilcolinesterase, que sejam menos tóxicos, mais efetivos e com menor custo, torna-se necessário [44, 47].

Alguns tratamentos para esta doença utilizam não só compostos que sejam inibidores da acetilcolinesterase, mas também altos níveis de antioxidantes, pois se faz necessário o combate ao estresse oxidativo comum nos portadores de Alzheimer.

Esse estresse surge principalmente da superprodução de radicais livres devido a uma desequilíbrio na produção de antioxidantes pelas células, sendo um fator importante no desenvolvimento de muitas doenças. Nesse sentido, os produtos naturais se tornam fontes em potencial para reduzir este desequilíbrio, pois muitos deles possuem a capacidade de atuar como antioxidantes [48].

Compostos isolados de algumas espécies de *Croton* mostraram atividade frente a enzima acetilcolinesterase como no trabalho desenvolvido por Aderogba *et al.* [49], no qual foi descrito a atividade inibidora dos quatro compostos isolados do extrato metanólico das folhas de *Croton penduliflorus* a quercetina-3-O-ramnosídeo **(1)**, canferol-3-O-ramnosídeo **(2)**, protocatecualdeído **(3)** e ácido *p*-hidroxibenzóico **(4)**. Além destes, os compostos 6-hidroxi-1-metil-2-dimetil-3,4-tetra-hidro- $\beta$ -carbolina **(5)**, (S)-magnoflorina **(6)**, (+)-menisperina **(7)**, taspina **(8)** e moschamina **(9)** isolados do extrato etanólico da casca do caule de *Croton heliotropiifolius* Kunth. também mostraram alta atividade de inibição da acetilcolinesterase [50] (Figura 1).

**Figura 1** - Compostos isolados de *C. penduliflorus* e *C. heliotropiifolius* com atividade acetilcolinesterase



Considerando as colaborações existentes com grupos de pesquisa que avaliam atividades biológicas e as informações mencionadas acima sobre as atividades citotóxicas e anticolinesterásicas em espécies de *Croton*, foi realizado uma investigação na espécie em estudo para avaliar seu potencial biológico.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 A Família Euphorbiaceae

É uma das mais abrangentes da ordem Malpighiales, compreendendo um dos grupos taxonômicos mais complexos entre as Eudicotiledôneas e apresentando uma morfologia altamente diversificada [51, 52].

Segundo Webster [53], Euphorbiaceae é composta de 317 gêneros, representada em todo o planeta nas regiões tropicais e subtropicais por um total de 8.000 espécies divididas em 5 subfamílias: Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Crotonoideae, Acalyphoideae e Euphorbioideae. Nas Américas contém cerca de 2500 espécies distribuídas em 92 gêneros [54]. No Brasil, ocorre cerca de 1100 espécies e 72 gêneros encontrados em todos os tipos de vegetação do país [52, 54-56]. Na vegetação caatinga, a Euphorbiaceae representa a terceira maior família com 165 espécies descritas, sendo que 17 espécies são endêmicas [57].

O uso medicinal é o mais representativo para as espécies dessa família, embora outros usos como a utilização da madeira e alimentos sejam citados. As espécies de Euphorbiaceae têm grande destaque na atividade econômica entre as Eudicotiledôneas principalmente para a região Nordeste do Brasil. Um exemplo é o uso da espécie *Manihot esculenta* Crantz na alimentação, da qual se extrai a farinha de mandioca [55].

Por outro lado, embora as espécies desta família estão amplamente distribuídas no Brasil, existem algumas que ainda não foram estudadas quanto à sua utilização ou composição química [51, 54, 58].

A família Euphorbiaceae destaca-se pelo número expressivo de espécies encontradas dentre as Angiospermas, sendo considerada um dos mais importantes grupos e de maior valor econômico [59].

Essa família é reconhecida por seus hábitos arbóreos, arbustivos, subarbustivos, herbáceas e trepadeiras. Suas plantas são normalmente lactescentes, com folhas alternas, simples ou compostas, estipuladas, monóicas ou dióicas, com flores diclinas, flores pistilada característica do gineceu sincárpico, ovário súpero e comumente tricarpelar [55]. Seus frutos são



secos deiscentes ou indeiscentes, comumente do tipo cápsula esquizocárpicas, ou seja, com deiscência explosiva, abrindo-se em três mericarpos, conhecido como cápsula tricoca [56], ou ainda cápsula septífraga, loculidas e circundantes, drupóides (filotrimídios, drupas e nukulânios) e bacóides [53, 55, 56].

Apesar do grande número de espécies da família na área de extensão do semi-árido nordestino, são raros os estudos taxonômicos e os tratamentos florísticos, em que se estuda a distribuição de espécies de plantas em diversas áreas geográficas [60]. No entanto, há um grande interesse científico pela família, porque nela há várias espécies úteis abrangendo diferentes categorias de uso. Os gêneros com maiores números de espécies com indicação para o uso medicinal são o *Croton* com 58, seguido por *Euphorbia* com 13 e *Jatropha* com 9 [51, 54].

Em relação ao número de espécies existentes, destacam-se: *Euphorbia* L. (1.500), *Croton* L. (700), *Phyllanthus* L. (400), *Acalypha* L. (400), *Macaranga Thouars* (400), *Antidesma Burman* (150), *Drypetes Vahl* (150), *Jatropha* L. (150), *Manihot* Mill. (150) e *Tragia Plumier* (150) [55].

Em uma pesquisa florística realizada por Crepaldi *et al.* [51], na Região Florestal da Chapada do Araripe, no Nordeste do Brasil, foi possível encontrar 23 espécies pertencentes a 11 gêneros. O gênero mais representativo foi *Croton* (6 espécies), seguido por *Euphorbia* (4), *Manihot* (2), *Astraea* (2), *Cnidoscolus* (2), *Jatropha* (2), *Microstachys* (1), *Chamaesyce* (1), *Maprounea* (1), *Phyllanthus* (1) e *Ricinus* (1). A espécie *Croton heliotropiifolius* foi um dos arbustos coletados em todos os ambientes dentro da Floresta Nacional do Araripe, a qual foi citada, pela população local, como cicatrizante de feridas e útil na purificação do sangue.

Em um estudo fitoquímico das espécies dessa família ficou evidenciado a presença de compostos biologicamente ativos, tais como flavonoides, saponinas, terpenos (di e triterpenoides), ésteres, alcalóides, glicosídeos cianogênicos, taninos, lecitinas e glicoproteínas [54].

## 2.2 Gênero *Croton* L.

O gênero mais estudado da família Euphorbiaceae é *Croton* L., pertencente a subfamília Crotonoideae com cerca de 1200 espécies, apresentando alta representatividade na flora brasileira com cerca de 300 espécies encontradas nos diferentes tipos de vegetação. No entanto, os estudos envolvendo espécies de *Croton* no Nordeste brasileiro estão limitados a trabalhos florísticos e/ou fitossociológicos [59, 61, 62].

Esse gênero caracteriza-se por apresentar diversos metabólitos secundários com alta diversidade química, justificando suas propriedades medicinais e tóxicas. Dentre estes metabólitos destacam-se: diterpenóides, triterpenóides, esteróides, alcalóides e derivados fenólicos, principalmente flavonoides, lignanas e proantocianidinas; mono e sesquiterpenoides comuns nos óleos essenciais [63].

Os terpenóides pertencem a uma classe de compostos que prevalece no gênero *Croton*, destacando os diterpenos de esqueleto clerodano que formam um grupo de substâncias abrangente, apresentando mais de 800 compostos conhecidos [64]. Dentre as propriedades biológicas, as espécies de *Croton* apresentam ação anti-inflamatória, antitumoral, citotóxica, antireumática, antiulcerogênica, antidiabética, analgésica e como inibidores da enzima acetilcolinesterase, entre outras [62, 65-69].

Várias espécies de *Croton* se desenvolvem em locais como margens de estradas, rios e clareiras de matas e produzem flores e frutos na maior parte do ano [64].

A terminologia dos tipos de tricomas do gênero *Croton* é difícil de padronizar devido a sua grande diversidade morfológica. Dois tipos principais de tricomas foram reconhecidos dentro do gênero, os pêlos estrelados, e os cabelos lepidotes [70]. Dessa forma, tanto nas classes estreladas como nas lepidóticas, há muita variação e, para comparações, foi necessário definir subclasses morfológicas de tricomas. Assim no gênero *Croton* são reconhecidos sete tipos básicos de tricomas: lepidote, estrelado, fasciculado ou rosulado, fasciculado-estipular, glandular, papilar e dendrítico [70, 71].

O número de espécies de *Croton* estudado é muito pequeno, apesar de existir um grande número de compostos isolados e atividades biológicas investigadas, tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico [64].

A literatura relata o uso de espécies de *Croton* na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades, sendo que algumas estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Uso de espécies de *Croton* na medicina tradicional

Espécies	Partes da planta	Principais usos
<i>C. stipuliformis</i>	Exsudatos	Tratamento de úlceras estomacais [72].
<i>C. caudatus</i>	Caule	Tratamento da artrite e malária [73].
<i>C. zambesicus</i> Muell. Arg.	Decocção das folhas e raízes	Tratamento de hipertensão [74].
<i>C. ururucana</i> Baill.	Látex	Tratamento de feridas e úlcera de animais [75].
<i>C. zambesicus</i> Muell. Arg.	Decocção das folhas	Tratamento de disenteria, febre e convulsões [76].
<i>C. cajucara</i> Benth.	Chá das folhas e casca do caule	Tratamento da diabetes, níveis elevados de colesterol, distúrbios gastrointestinais e hepáticos e perda de peso [77].
<i>C. celtidifolius</i> Baill.	Infusão das cascas	Tratamento de doenças inflamatórias, leucemia, úlcera e reumatismo [77].

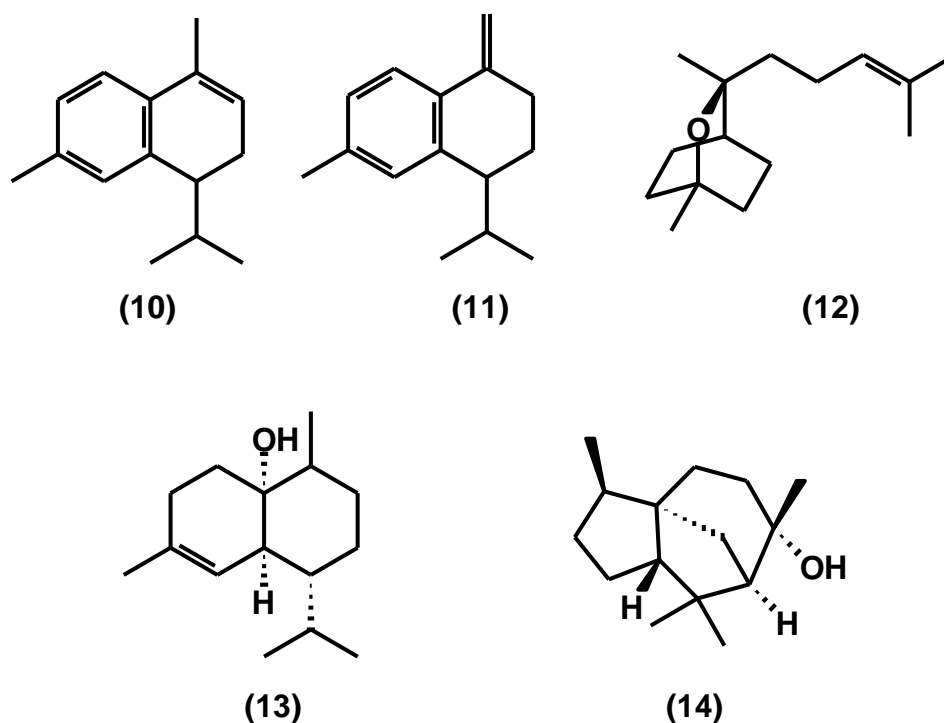
### 2.2.1 Compostos Isolados do Gênero *Croton* L. e suas Atividades Biológicas

As espécies do gênero *Croton* apresentam uma série de propriedades contra uma ampla variedade de disfunções e patologias, como por exemplo,

úlceras gástricas, diarreia, feridas infecciosas microbianas e virais, inflamações e artrite. Isso justifica o grande interesse por estudos das espécies deste gênero, tanto dos extratos quanto dos óleos essenciais. Em geral, a composição do óleo essencial de *Croton* ssp. pode variar muito em relação à parte da planta e à área geográfica, sendo observada abundância relativamente diferente de sesquiterpenos e monoterpenos com predominância de sesquiterpenos [78].

Rossi *et al.* [78], detectaram e identificaram setenta e quatro constituintes químicos do óleo essencial de *C. lechleri*, sendo os mais abundantes os sesquiterpenos: o  $\alpha$ -calacoreno (11,29%) **(10)**,  $\beta$ -calacoreno (4,34%) **(11)**, sesquicineol (17,29%) **(12)**, 1,10-*epi*-cubenol (4,75%) **(13)** e o *epi*-cedrol (4,09%) **(14)** (Figura 2).

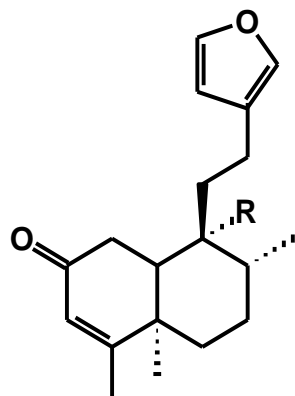
**Figura 2** - Compostos mais abundantes identificados no óleo essencial de *C. lechleri*



A partir do extrato diclorometano das raízes de *C. campestris* St Hil. foram isolados três diterpenos nomeados velamona (*ent*-15,16-epoxi-2-oxo-3,13 **(16)**), 14-clerodatrieno) **(15)**, velamolona (*ent*-15,16-epoxi-20-hidroxi-2-

oxo-3,13 (16), 14-clerodatrieno) **(16)** e acetato de velamolona (*ent*- 15,16-epoxi-20-acetoxi-2-oxo-3,13 (16), 14-clerodatrieno) **(17)** [79] (Figura 3).

**Figura 3** - Compostos isolados de *C. campestris*



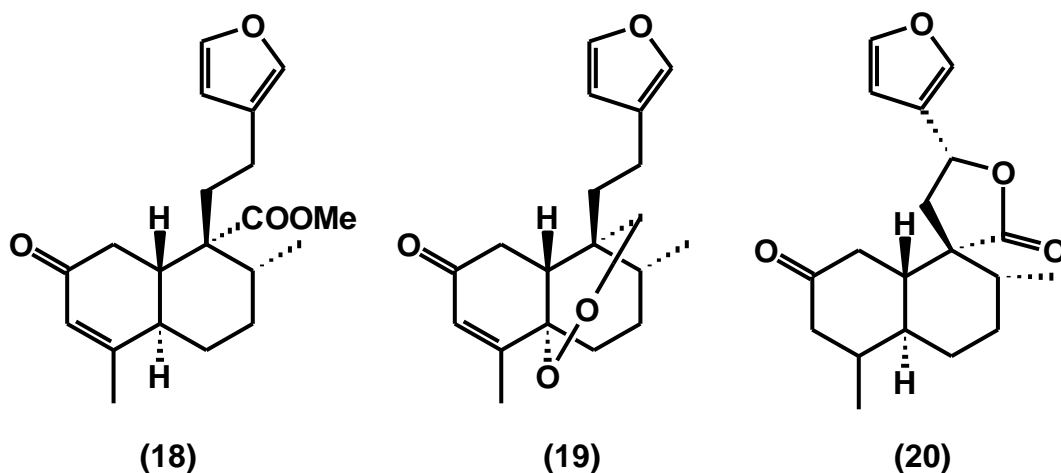
**(15)** R= Me

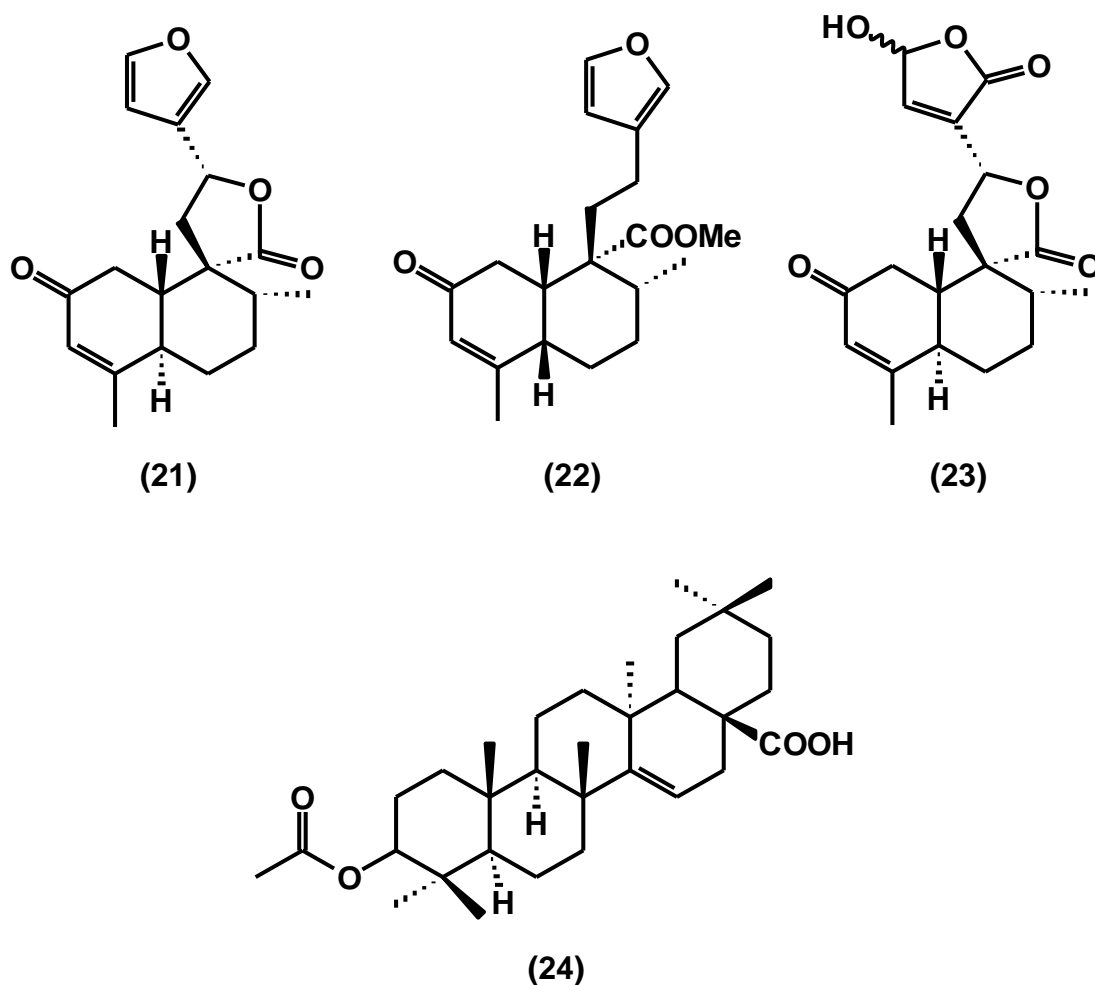
**(16)** R= CH<sub>2</sub>OH

**(17)** R= CH<sub>2</sub>OAc

Das cascas de *C. cajucara*, Maciel *et al.* [80] isolaram dois diterpenos clerodanos o *trans*-cajucarina B **(18)** e a sacacarina **(19)**, além dos diterpenos não-clerodanos a *trans*-crotonina **(20)**, *trans*-dehidrocrotonina **(21)**, os dois últimos já isolados por Kubo *et al.* [81], juntamente com a cajucarina B **(22)**, a cajucarinolida **(23)** e o ácido acetil aleuritólico **(24)** (Figura 4).

**Figura 4** - Compostos isolados de *C. cajucara*





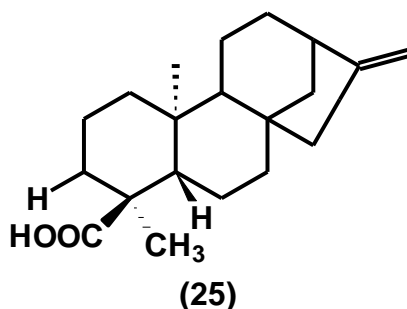
Campos *et al.* [82] relataram a atividade contra o *Trypanosoma cruzi* do extrato metanólico das cascas do caule de *C. cajucara* e dos compostos isolados desse extrato, sendo eles a *trans*-dehidrocrotonina **(21)** e o ácido acetil aleuritólico **(24)**. Os resultados mostraram que o extrato metanólico foi mais ativo contra o parasita quando comparado aos dois compostos isolados. Com estes dados, os autores reforçaram a importância na continuação do estudo fitoquímico desta espécie para a investigação de outros metabólitos presentes neste extrato.

Lima *et al.* [83] investigaram os efeitos dos diterpenos, *trans*-crotonina **(20)**, *trans*-dehidrocrotonina **(21)** e do ácido acetil aleuritólico **(24)** obtidos das cascas de *C. cajucara* contra as formas promastigotas e amastigotas axênicas (meio de cultura *in vitro*) e intracelulares de *Leishmania amazonensis*. Além disso, também foram investigados os efeitos dos compostos isolados sobre a enzima tripanotiona redutase de *L. amazonensis*. Os resultados mostraram

efeitos leishmanicidas *in vitro* para esta espécie e ação sobre a enzima tripanotona redutase, sendo a *trans*-dehidrocrotonina **(21)** a mais ativa em ambos os casos.

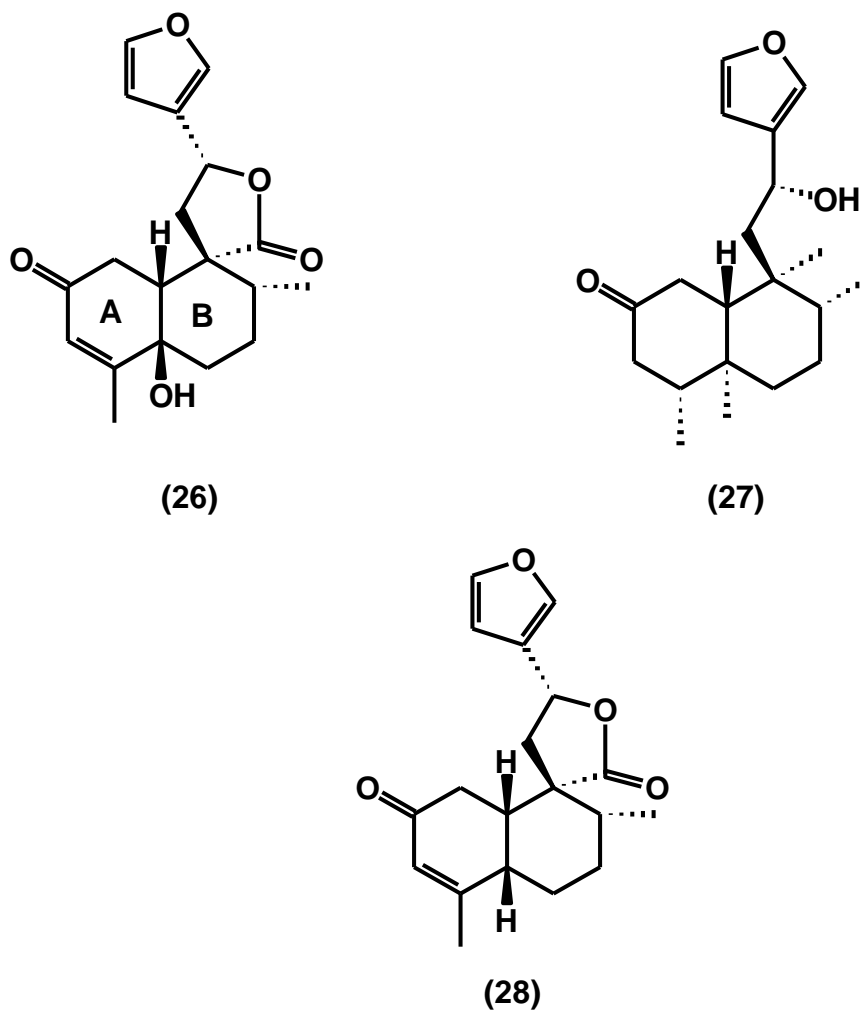
Pereira *et al.* [84] relataram o isolamento de um composto majoritário a partir do extrato clorofórmio das raízes de *C. antisyphiliticus*, o ácido *ent*-caur-16-en-18-óico **(25)** (Figura 5), sendo este o primeiro trabalho fitoquímico dessa espécie avaliando a atividade antimicrobiana do composto isolado contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados mostraram que o composto isolado apresenta atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus*.

**Figura 5** - Composto isolado de *C. antisyphiliticus*



Puebla *et al.* [85] isolaram das partes aéreas de *C. shiedeanus* diterpenos não clerodanos do tipo furano, o 5 $\beta$ -hidroxi-*cis*-dehidrocrotonina **(26)** e a (12*R*)-12- hidroxicascarillona **(27)**, além do *cis*-dehidroxicrotonina **(28)** e *trans*-dehidroxicrotonina **(21)** (Figura 6), este último previamente isolado de *C. cajucara* [81].

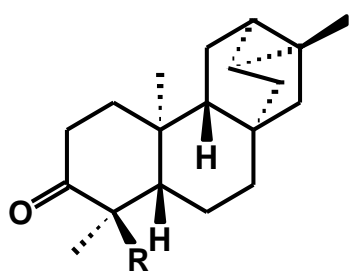
**Figura 6** - Compostos isolados de *C. shiedeanus*



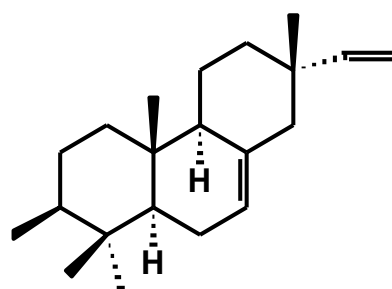
Em seu trabalho, Block *et al.* [86] citaram o isolamento de três diterpenos: o *ent*-18-hidroxi-trachiloban-3-ona **(29)**, isopimara-7,15-dien-3 $\beta$ -ol **(30)** e o *ent*-trachiloban-3-ona **(31)**, juntamente com o *trans*-fitol **(32)**,  $\alpha$ -amirina **(33)**,  $\beta$ -sitosterol **(34)** e estigmasterol **(35)** (Figura 7) a partir do extrato diclorometânico das folhas de *C. zambesicus*.



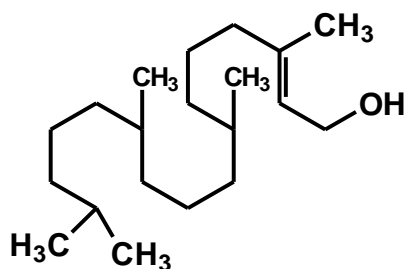
**Figura 7** - Compostos isolados de *C. zambesicus*



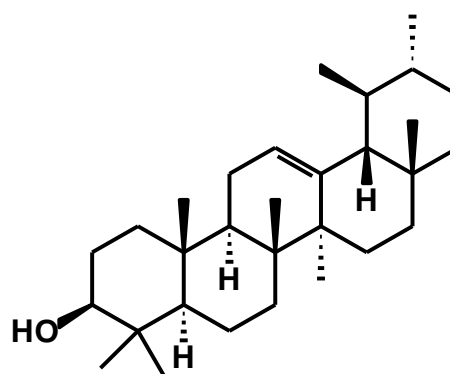
(29) R= CH<sub>2</sub>OH  
(31) R= CH<sub>3</sub>



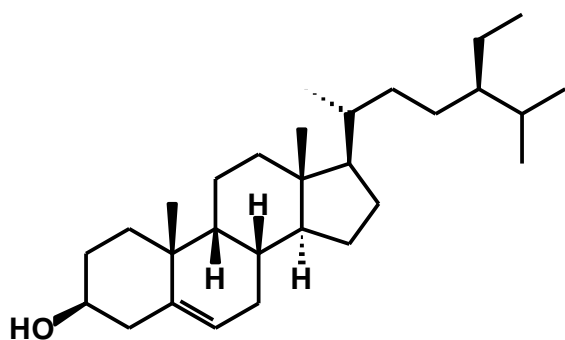
(30)



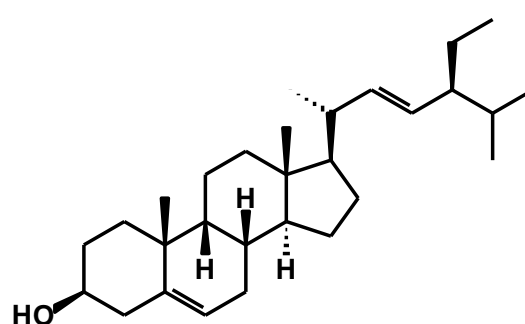
(32)



(33)

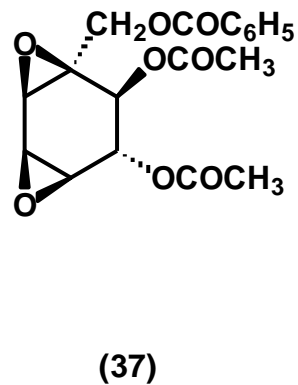
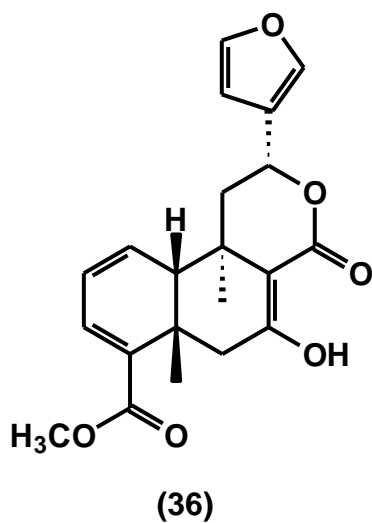


(34)

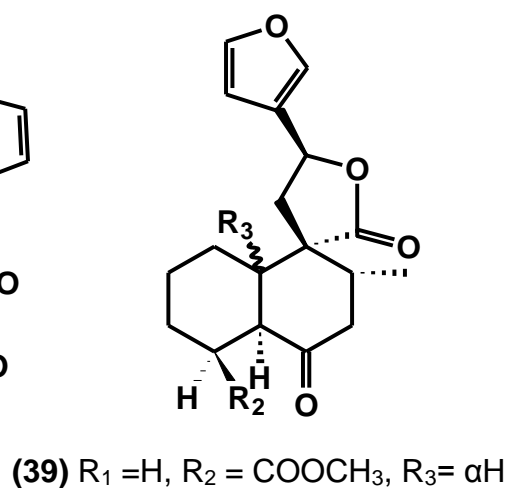
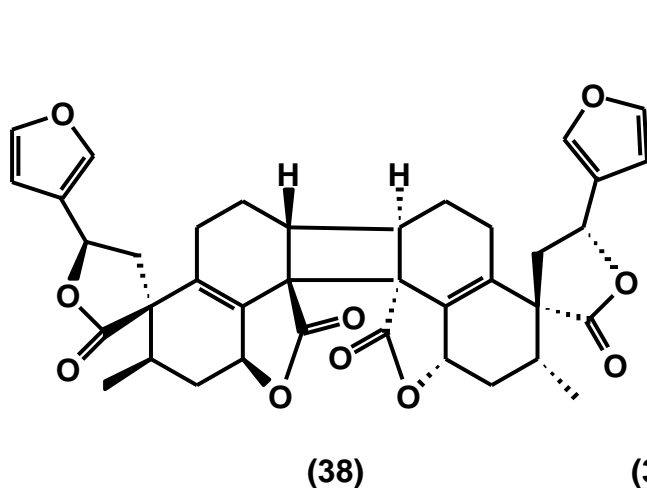


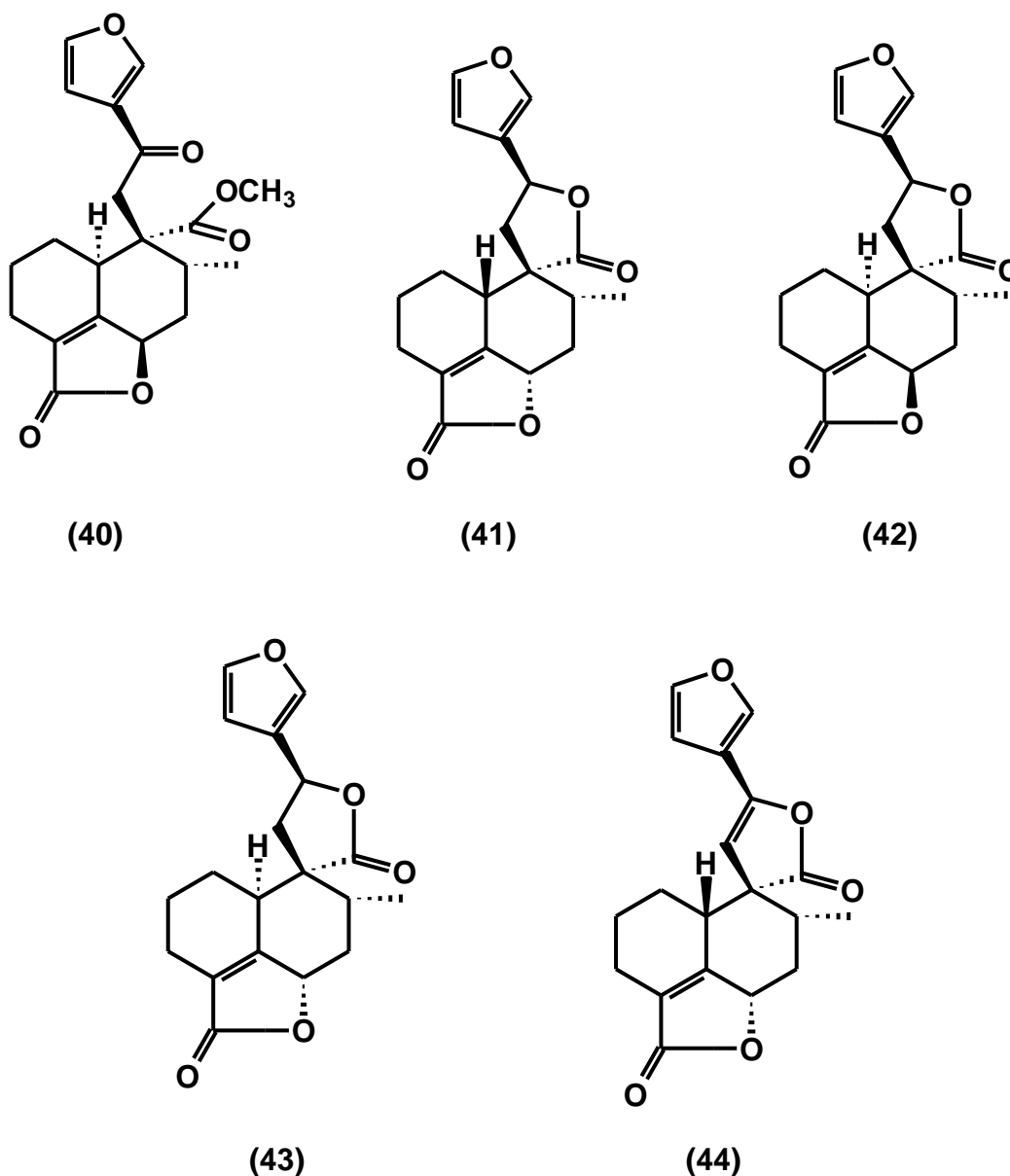
(35)

Do extrato hexânico dos frutos de *C. macrostachyus*, Tane *et al.* [87] isolaram um diterpeno clerodano, a crotomacrina **(36)** juntamente com a crotepoxida **(37)** (Figura 8).

**Figura 8** - Compostos isolados de *C. macrostachyus*

Pan *et al.* [88] apresentaram em seu trabalho o isolamento de diterpenóides do extrato etanólico dos galhos e folhas de *C. euryphyllus*, a crotoeurina A **(38)**, crotoeurina B **(39)**, crotoeurina C **(40)**, teucvina **(41)**, teucvidina **(42)**, isoteucvina **(43)** e a isocrotocaudina **(44)** (Figura 9). Além disso, os compostos **38** a **40** exibiram atividade neurítica estimulada por NGF (fator de crescimento nervoso) em células PC12 após 72h de incubação a uma concentração de 10  $\mu$ M.

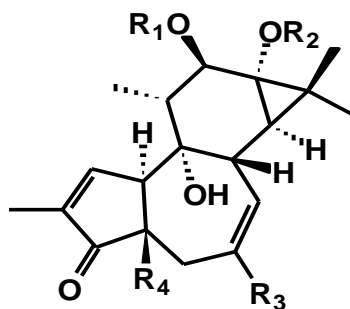
**Figura 9** - Compostos isolados de *C. euryphyllus*



No trabalho desenvolvido por Zang *et al.* [89] foi possível o isolamento de diterpenóides do extrato etanólico dos galhos e folhas de *C. tigilium* L., os crotonóides A-K (**45-55**), juntamente com 12-O-tigililforbol-13-(2-metil) butirato (**56**), 12-O-isobutirilforbol-13-acetato (**57**), 12-O-tigililforbol-13-propionato (**58**), 12-O-tigililforbol-13-isobutirato (**59**), 12-O-(2-metil) butirilforbol-13-acetato (**60**), 12-O-tigililforbol-13-acetato (**61**), 12-O-(2-metil) butirilforbol-13-isobutirato (**62**) e 12-O-tigilil-4-deoxi-4 $\alpha$ -forbol-acetato (**63**) (Figura 10). Ensaio citotóxicos *in vitro* contra células tumorais humanas foram feitos para os crotonóides A-K. Os resultados mostraram uma inibição moderada dos compostos **45** ao **54** em relação às linhagens HL-60 e A549, sendo que o composto **45** apresentou-se

- 

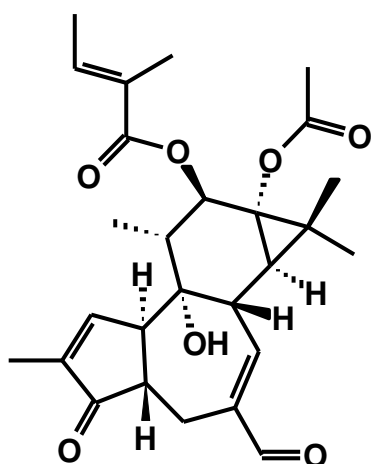
- (49)  $R_1 = \text{tiglil}$      $R_2 = \text{isobutiril}$      $R_3 = \text{O}$   
 (50)  $R_1 = \text{tiglil}$      $R_2 = \text{propionil}$      $R_3 = \text{O}$   
 (51)  $R_1 = \text{H}$      $R_2 = \text{decanoil}$      $R_3 = \text{O}$



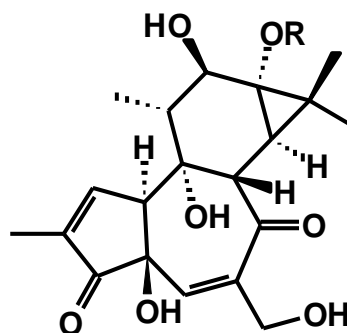
(52)	R <sub>1</sub> = tigilil	R <sub>2</sub> = isobutiril	R <sub>3</sub> = CHO	R <sub>4</sub> = β-OH
(53)	R <sub>1</sub> = 2-metilbutiril	R <sub>2</sub> = 2-metilbutiril	R <sub>3</sub> = CH <sub>2</sub> OH	R <sub>4</sub> = β-OH
(54)	R <sub>1</sub> = benzoil	R <sub>2</sub> = isobutiril	R <sub>3</sub> = CH <sub>2</sub> OH	R <sub>4</sub> = β-OH
(55)	R <sub>1</sub> = benzoil	R <sub>2</sub> = acetil	R <sub>3</sub> = CH <sub>2</sub> OH	R <sub>4</sub> = α-H
(56)	R <sub>1</sub> = tigilil	R <sub>2</sub> = 2-metilbutiril	R <sub>3</sub> = CH <sub>2</sub> OH	R <sub>4</sub> = β-OH
(57)	R <sub>1</sub> = isobutiril	R <sub>2</sub> = acetil	R <sub>3</sub> = CH <sub>2</sub> OH	R <sub>4</sub> = β-OH
(58)	R <sub>1</sub> = tigilil	R <sub>2</sub> = propionil	R <sub>3</sub> = CH <sub>2</sub> OH	R <sub>4</sub> = β-OH
(59)	R <sub>1</sub> = tigilil	R <sub>2</sub> = isobutiril	R <sub>3</sub> = CH <sub>2</sub> OH	R <sub>4</sub> = β-OH
(60)	R <sub>1</sub> = 2-metilbutiril	R <sub>2</sub> = acetil	R <sub>3</sub> = CH <sub>2</sub> OH	R <sub>4</sub> = β-OH
(61)	R <sub>1</sub> = tigilil	R <sub>2</sub> = acetil	R <sub>3</sub> = CH <sub>2</sub> OH	R <sub>4</sub> = β-OH
(62)	R <sub>1</sub> = 2-metilbutiril	R <sub>2</sub> = isobutiril	R <sub>3</sub> = CH <sub>2</sub> OH	R <sub>4</sub> = β-OH
(63)	R <sub>1</sub> = tigilil	R <sub>2</sub> = acetil	R <sub>3</sub> = CH <sub>2</sub> OH	R <sub>4</sub> = α-H

Do extrato etanólico das folhas de *C. tigium* foram isolados ésteres de diterpenos, 4-deoxi-20-oxoforbol-12-tigilil-13-acetato **(64)**, 7-oxo-5-ene-forbol-13-(2-metil) butirato **(65)**, 7-hidroxi-forbol-5-ene-13-(2-metil) butirato **(66)**, 7-hidroxi-forbol-5-ene-13-isobutirato **(67)**, 13-O-(2-metil) butiril-forbol **(68)**, crotognoides F **(50)**, 12-O-tigililforbol-13-acetato **(61)**, além do forbol **(69)** (Figura 11). As atividades citotóxicas e antituberculose destes compostos foram testadas e os resultados mostraram fortes atividades citotóxicas contra a linhagem celular K562, utilizando como controle positivo o taxol [91]. Segundo os autores a atividade citotóxica desses diterpenos do tipo tigliano dependem fortemente das espécies de células tumorais. Estas observações reforçam àquelas realizadas por Wang *et al.* [90] os quais justificaram a forte atividade dessa classe de compostos (diterpenos do tipo tigliano) à presença de alguns grupos específicos na estrutura. Atividades antituberculose significativas foram observadas pelos compostos **50**, **61**, **64** e **65**, reforçando a necessidade de mais estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* desses compostos, os quais podem ser potencialmente úteis para o desenvolvimento de drogas para esta enfermidade [91].

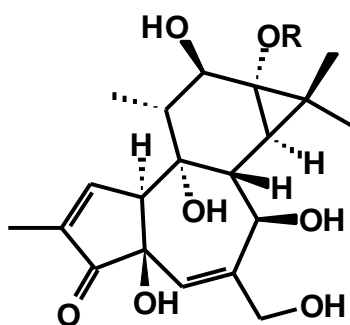
**Figura 11** - Compostos isolados de *C. tigium*



(64)

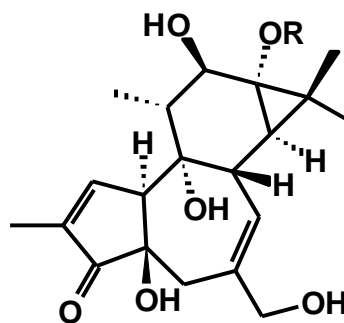


(65) R= 2-metilbutiril



(66) R= 2-metilbutiril

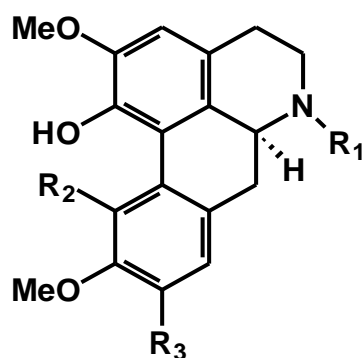
(67) R= isobutiril



(68) R= 2-metilbutiril

(69) R= H

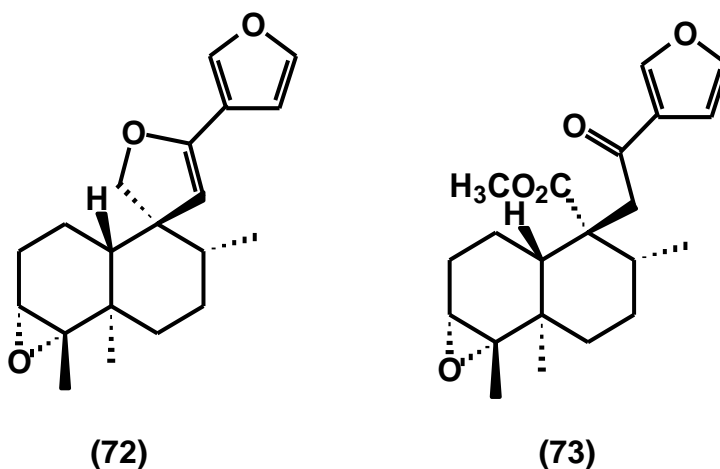
Ravanelli *et al.* [63] relataram o isolamento e identificação de dois alcalóides do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. echinocarpus* Baill. a coridina (**70**) e a norisoboldina (**71**) (Figura 12). A atividade *in vitro* contra o HIV-1 foi testada para os alcaloides isolados, o extrato bruto e as frações metanólicas e hexânicas. Os resultados mostraram que a fração metanólica foi a mais ativa (32% de inibição da enzima transcriptase reversa do HIV-1 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) do que o extrato bruto e a fração hexânica. As duas substâncias isoladas foram testadas usando concentrações de 5 a 450  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A Coridina (**70**) foi menos potente ( $\text{IC}_{50} = 356,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em comparação com a norisoboldina (**71**) ( $\text{IC}_{50} = 153,7 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

**Figura 12** - Compostos isolados de *C. echinocarpus*

(70)  $R_1 = \text{Me}$   $R_2 = \text{OMe}$   $R_3 = \text{H}$

(71)  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{H}$   $R_3 = \text{OH}$

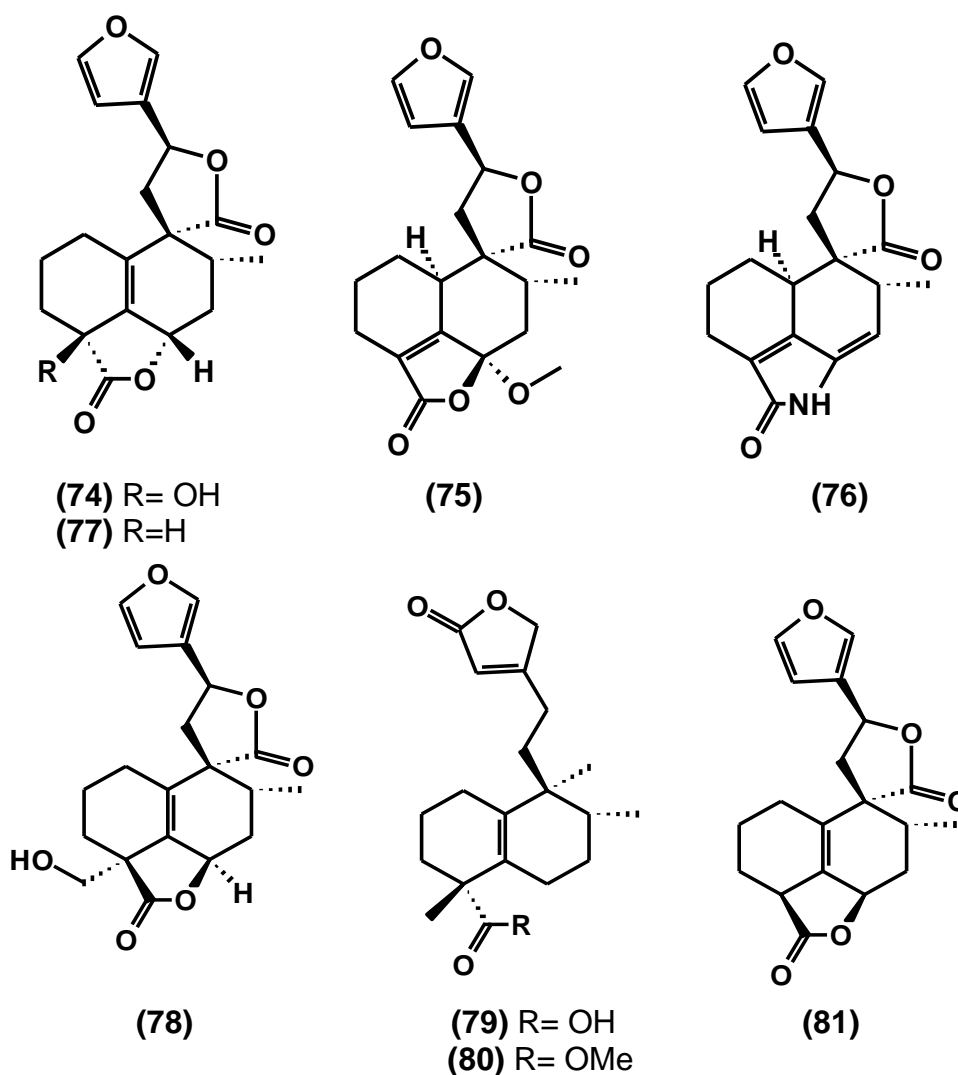
Do extrato metanólico das partes aéreas de *C. yanhuui*, Sun *et al.* [92] isolaram dois diterpenos do tipo clerodano, o crotonpeno A (**72**) e crotonpeno B (**73**) (Figura 13). A atividade de crescimento de neurite induzida por NGF (Fator de crescimento neural) a partir de células PC12 foi testada para os dois novos diterpenos isolados. Os resultados mostraram que ambos promoveram o crescimento neurítico das células nervosas contra a degeneração neural, podendo ser potencialmente útil para o desenvolvimento de agentes antineurodegenerativos como a doença de Alzheimer e outros distúrbios neurológicos.

**Figura 13** - Compostos isolados de *C. yanhuui*

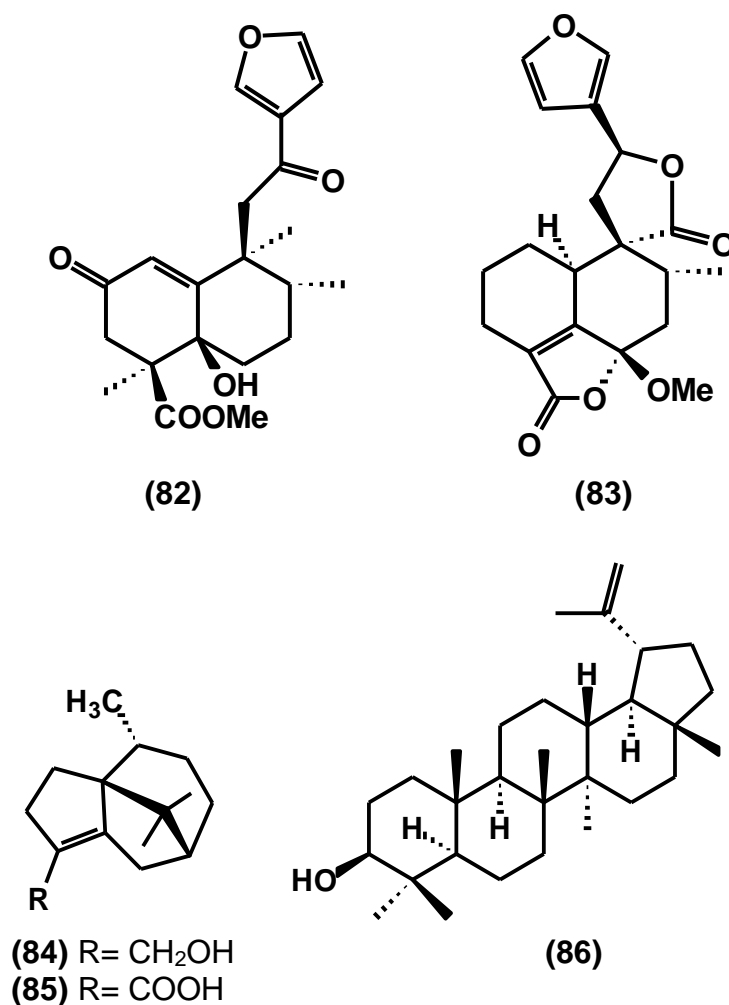
Qiu *et al.* [93] isolaram das raízes de *C. crassifolius* diterpenos clerodanos, o cracroson A e B (**74**, **75**), um alcalóide diterpenóide do tipo

clerodano, o cracroson C (**76**), junto com a crassifolina H (**77**), crassifolina I (**78**), crassifolina B (**79**), crassifolina A (**80**), isoteufina (**81**), teucvidina (**42**), teucvina (**41**), chetafanina I (**82**), (12S)-15,16-epoxi-6 $\beta$ -metoxi-19-norneoclerodano-4,13(16), 14-trieno-18,6 $\alpha$ ,20,12-diolida (**83**), ciperenol (**84**), ácido ciperenóico (**85**), ácido acetil aleuritálico (**24**) e o lupeol (**86**) (Figura 14). A atividade citotóxica *in vitro* contra a linhagem de célula tumoral CT 26.WT (Linhagem celular do Carcinoma Cólon murino), utilizando a cisplatina como controle positivo, foi testada para todos os compostos. Os resultados mostraram que o composto (**79**) foi o mais ativo de todos os compostos testados. No entanto sua citotoxicidade foi considerada fraca, pois apresentou um IC<sub>50</sub> de 96,6  $\pm$  17,3  $\mu$ M, quando comparada a da cisplatina, cujo valor de IC<sub>50</sub> foi de 33,3  $\pm$  2,6  $\mu$ M.

**Figura 14** - Compostos isolados de *C. crassifolius*

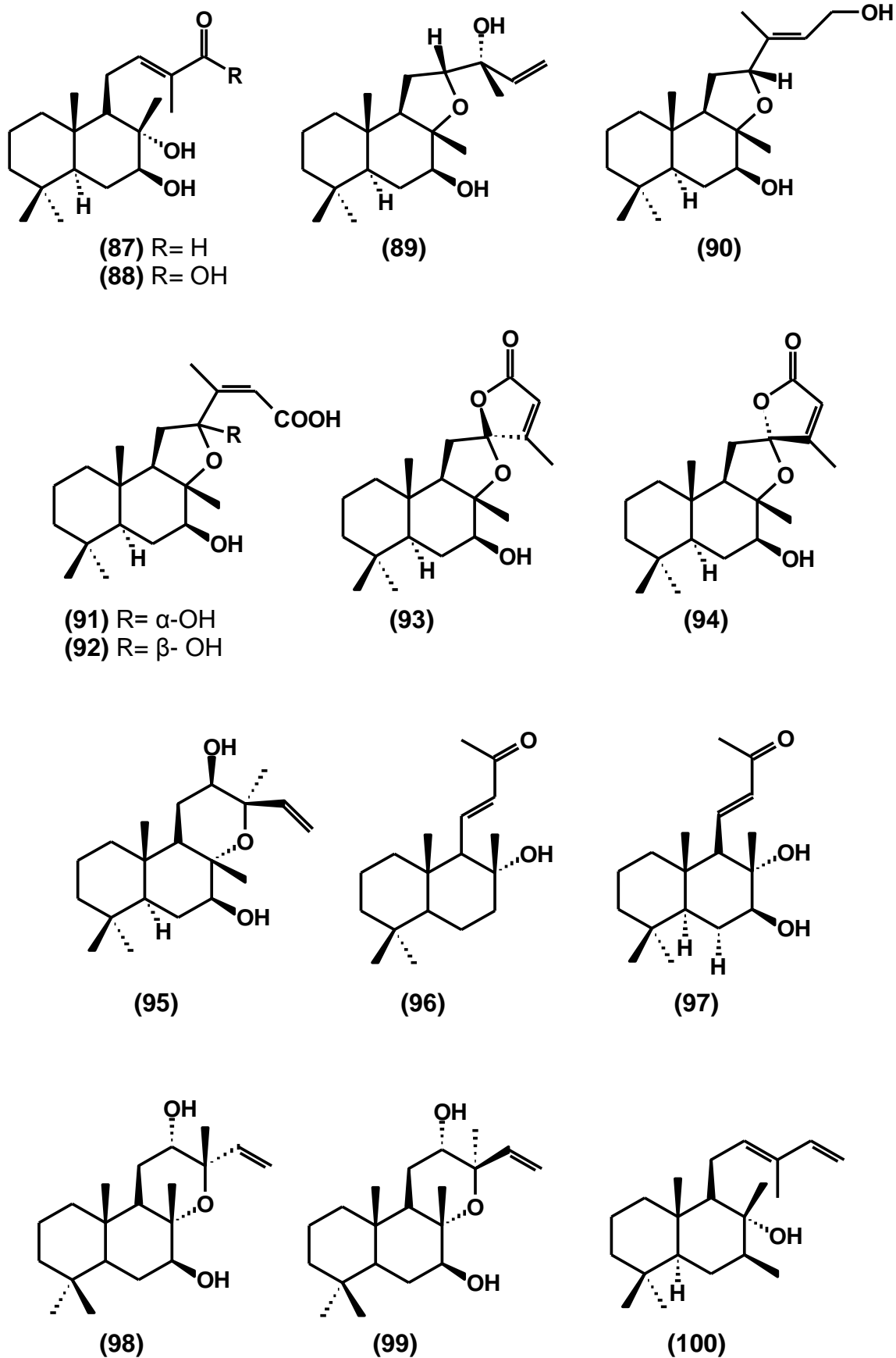


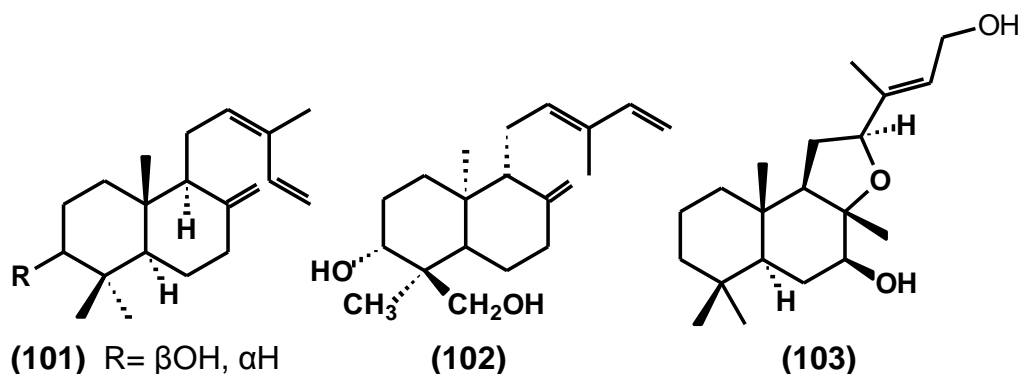




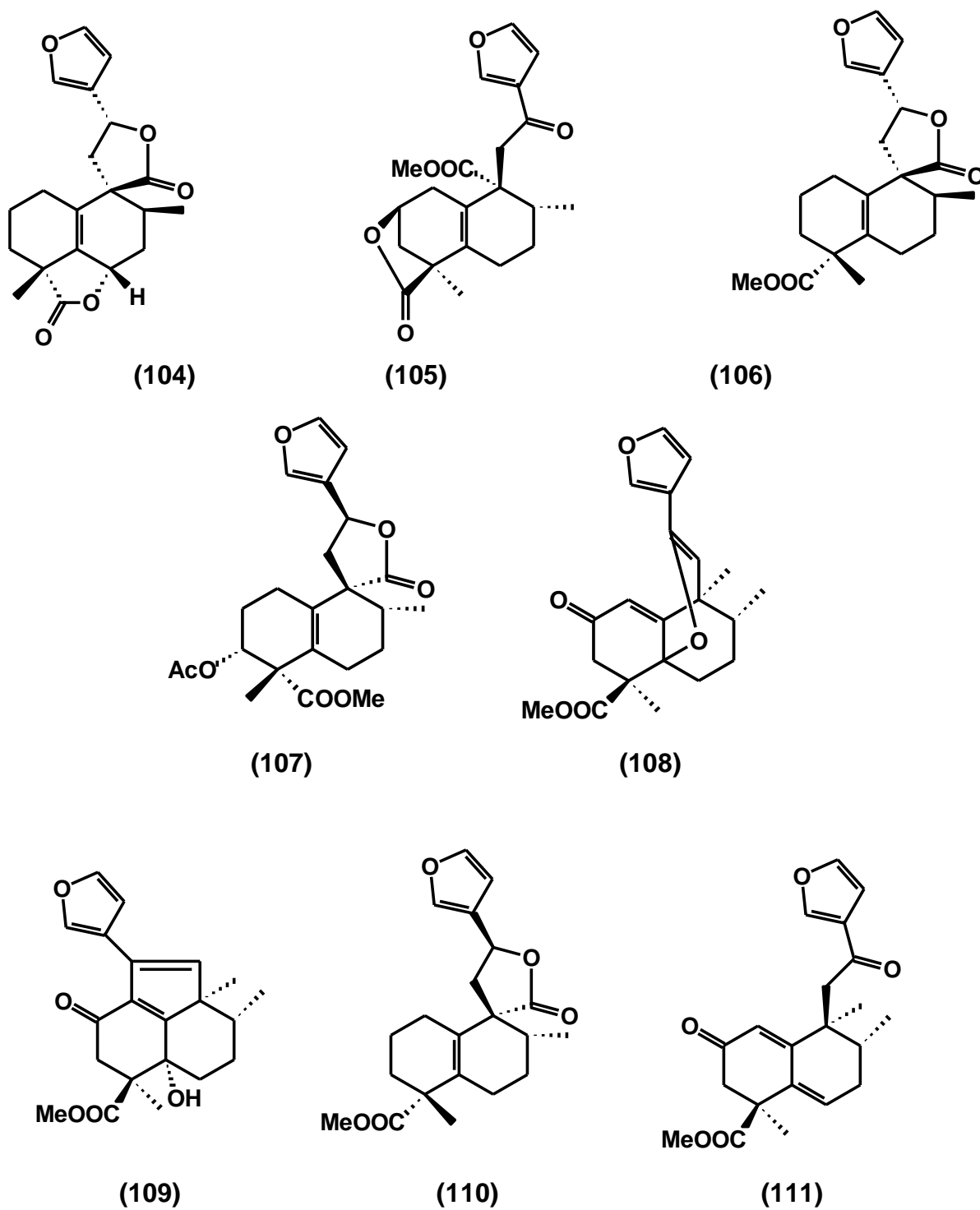
Do extrato éter de petróleo das folhas e caules de *C. laui*, Yang *et al.* [94] isolaram nove novos diterpenos: launine A-I (**87-95**), além do (11*E*)-14,15-*bisnor*-8 $\alpha$ -hidroxi-11-*labden*-13-ona (**96**), esterebina D (**97**), óxido 7 $\beta$ , 12 $\alpha$ -dihidroximanoil (**98**), óxido 7 $\beta$ , 12 $\alpha$ -dihidroxi-13-*epi*-manoil (**99**), nidorellol (**100**), 3 $\beta$ -hidroxi-*labd*-8(17), 12*Z*, 14-trieno (**101**), 3 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-*labda*-8(17), 12*E*, 14-trien-18-ol (**102**) e crotonolídeo I (**103**) (Figura 15). Todos os compostos foram avaliados *in vitro* para atividade anti-inflamatória, utilizando a indometacina como controle positivo. Os resultados mostraram que, embora ativos em relação aos outros testados, os compostos **87**, **90**, **93**, **94** e **100** apresentaram fraca atividade anti-inflamatória com valores de IC<sub>50</sub> entre 42,73 a 93,04  $\mu$ M, quando comparados a indometacina, cujo IC<sub>50</sub> foi de 16,5  $\mu$ M.

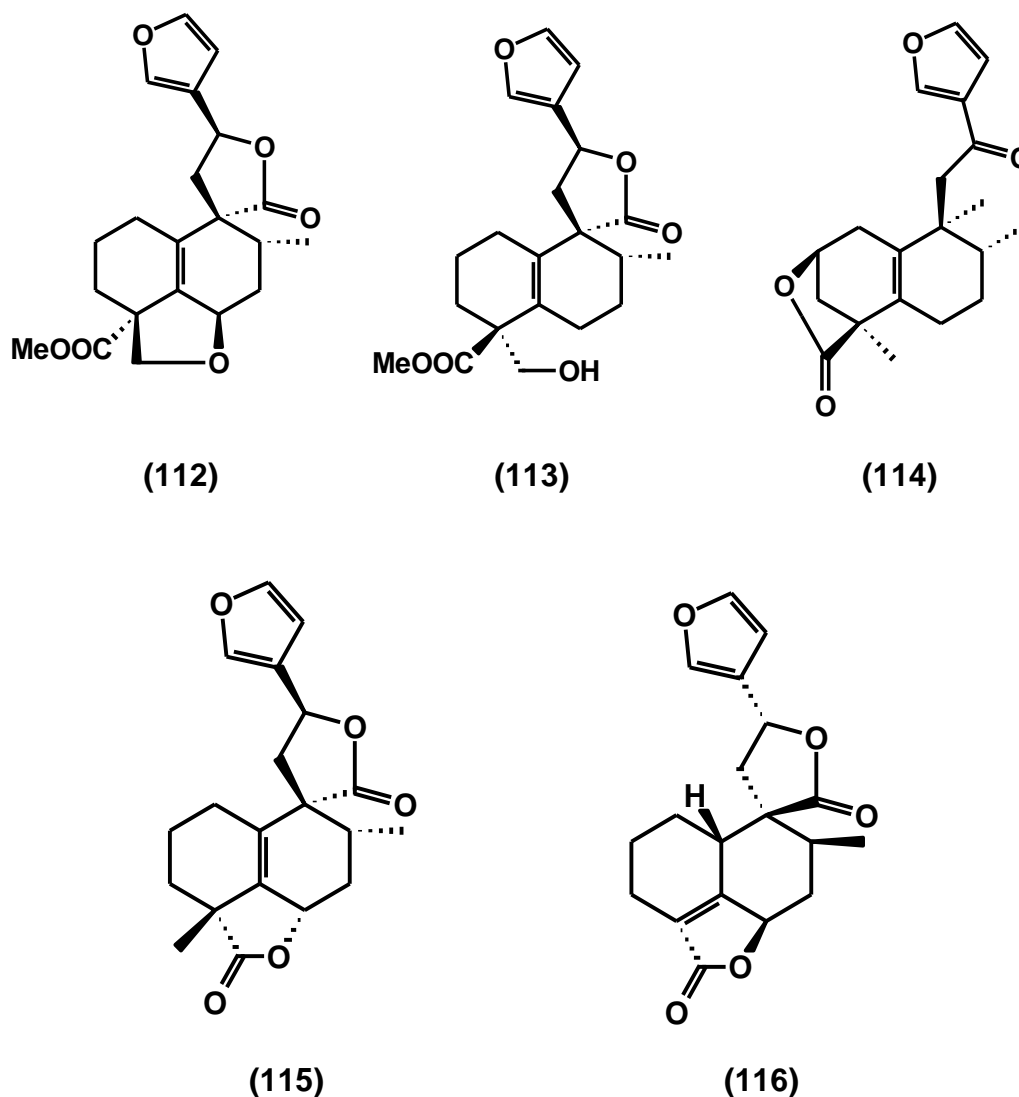
Figura 15 - Compostos isolados de *C. laui*





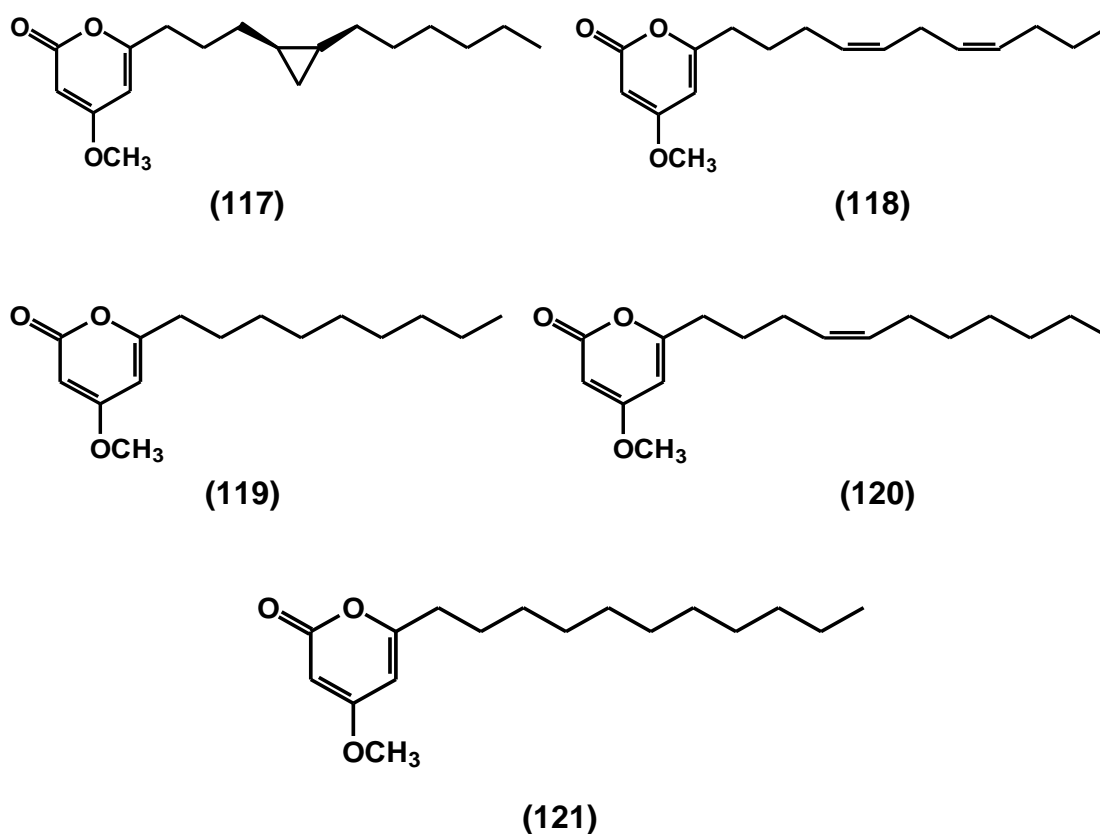
Tian *et al.* [95] descreveram o isolamento de diterpenos clerodanos das raízes de *Croton crassifolius*: crassifolius A (**104**), crassifolius B (**105**), crassifolius C (**106**), crassifolina F (**107**), metil-9-(furan-3-il)-2,7,13-trimetil-4-oxo-10-oxatriciclo [5.3.3.0<sup>1,6</sup>] trideca-5,8-dieno-2-carboxilato (**108**), chetafanina I (**82**), crassifoliusina A (**109**), penduliflaworosina (**110**), crassifolina C (**111**), crassifolina D (**112**), crassifolina L (**113**), 6-[2-(furan-3-il)-2-oxoetil]-1,5,6-trimetil-10-oxatriciclo [7.2.1.0<sup>2,7</sup>] dodec-2 (7)-en-11-ona (**114**), neoclerodan-5,10-en-19,6b;20, 12-diolídeo (**115**), teucvina (**41**), isoteucvina (**43**), crassifolina H (**77**) e crassifolina J (**116**) (Figura 16). Neste trabalho os compostos isolados foram submetidos a triagem de inibição do crescimento celular frente às linhagens de câncer do fígado humano (HepG2 e Hep3B), utilizando o 5-fluorouracil (5-Fu) como controle positivo. Os resultados mostraram que o composto crassifolius A (**104**) exibiu boa citotoxicidade contra a linhagem Hep3B com valor IC<sub>50</sub> de 17,91  $\mu$ M, quando comparado com o do 5-fluorouracil com valor de IC<sub>50</sub> de 10,53  $\mu$ M. Estudos adicionais do mecanismo antitumoral da inibição do crescimento celular induzida pelo composto (**104**) indicaram que o mesmo causou a morte celular apoptótica em células Hep3B através da detecção de alterações morfológicas. No entanto, os autores sugerem uma investigação completa dos mecanismos moleculares à citotoxicidade desse composto. Os compostos **104**, **111** e **114** mostraram potencial atividade frente às células HepG2, com valores de IC<sub>50</sub> de 42,04; 51,65 e 45,22  $\mu$ M, respectivamente, quando comparado com o da 5-fluorouracil com valor de IC<sub>50</sub> de 49,72  $\mu$ M.

**Figura 16** - Compostos isolados de *C. crassifolius*



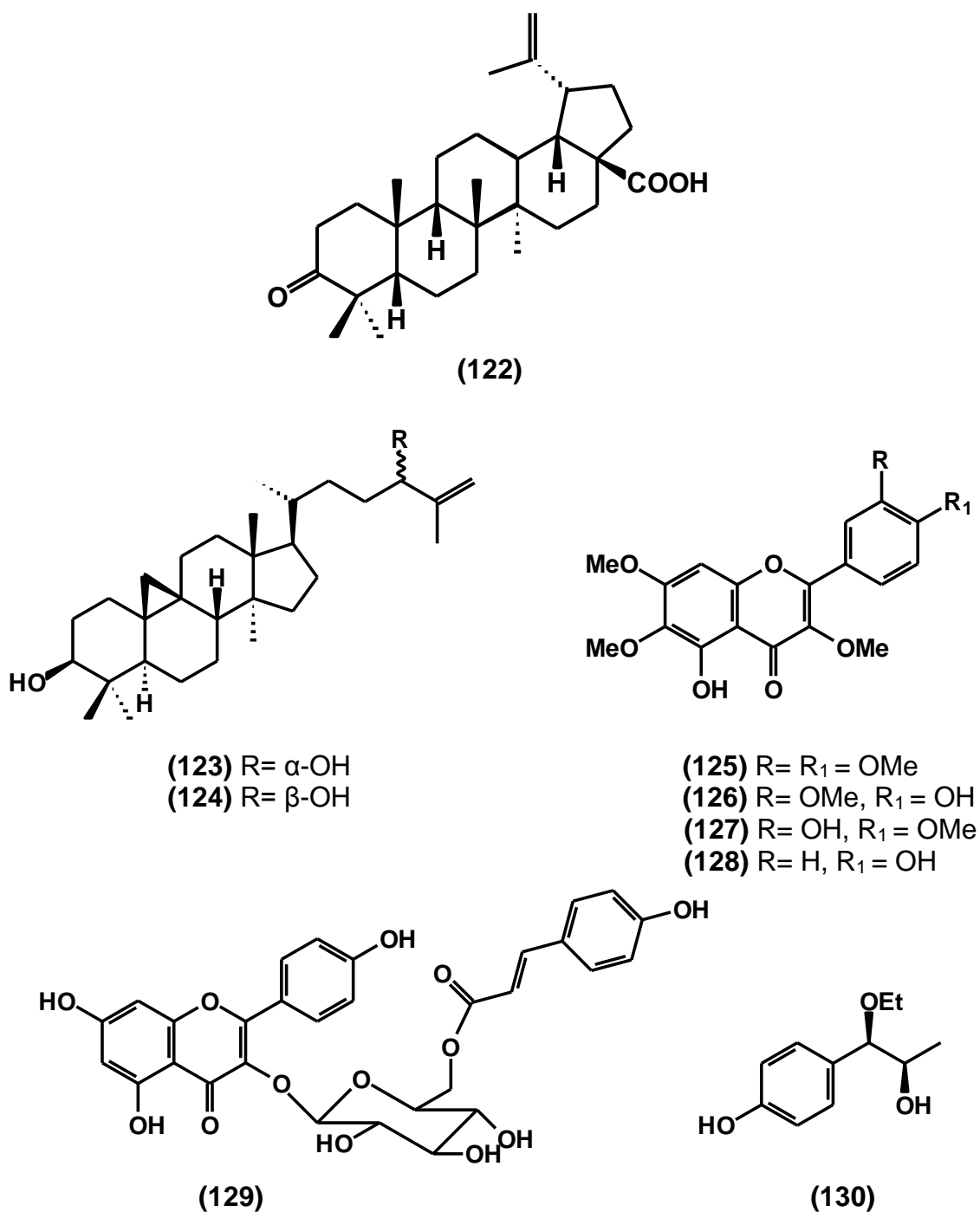
Uma investigação química do extrato etanólico das raízes de *Croton crassifolius* levou ao isolamento de cinco derivados da piran-2-ona, a crassifoliuspirano A (**117**), crassifoliuspirano B (**118**), 4-metoxi-6-nonil-2H-piran-2-ona (**119**), a crotonpirona B (**120**) e crotonpirona A (**121**) (Figura 17). Testes de citotoxicidade dos compostos isolados contra duas linhagens celulares de câncer de fígado (HepG2 e MHCC97H), utilizando o 5-fluorouracil (5-FU) como controle positivo, mostrou que o composto (**117**) foi o mais potente sobre as células HepG2 com valor de  $IC_{50}$  de 9,8  $\mu$ M [96].

**Figura 17** - Compostos isolados de *C. crassifolius*



Do extrato acetônico e etanólico das folhas e caule de *C. sellowii* Baill., Palmeira Júnior *et al.* [65] descreveram o isolamento do  $\beta$ -sitosterol (**34**), estigmasterol (**35**), ácido betulônico (**122**), cicloart-25-eno-3 $\beta$ ,24 $\alpha$ -diol (**123**), cicloart-25-eno-3 $\beta$ ,24 $\beta$ -diol (**124**), artemetina (**125**), crisosplenetina (**126**), casticina (**127**), penduletina (**128**), canferol-3-O-(6"-O-*p*-cumaroil)- $\beta$ -D-glicopiranoose mais conhecido como tilirosídeo (**129**) e treo-7-etoxi-8-hidroxi-diidroanol (**130**) (Figura 18).

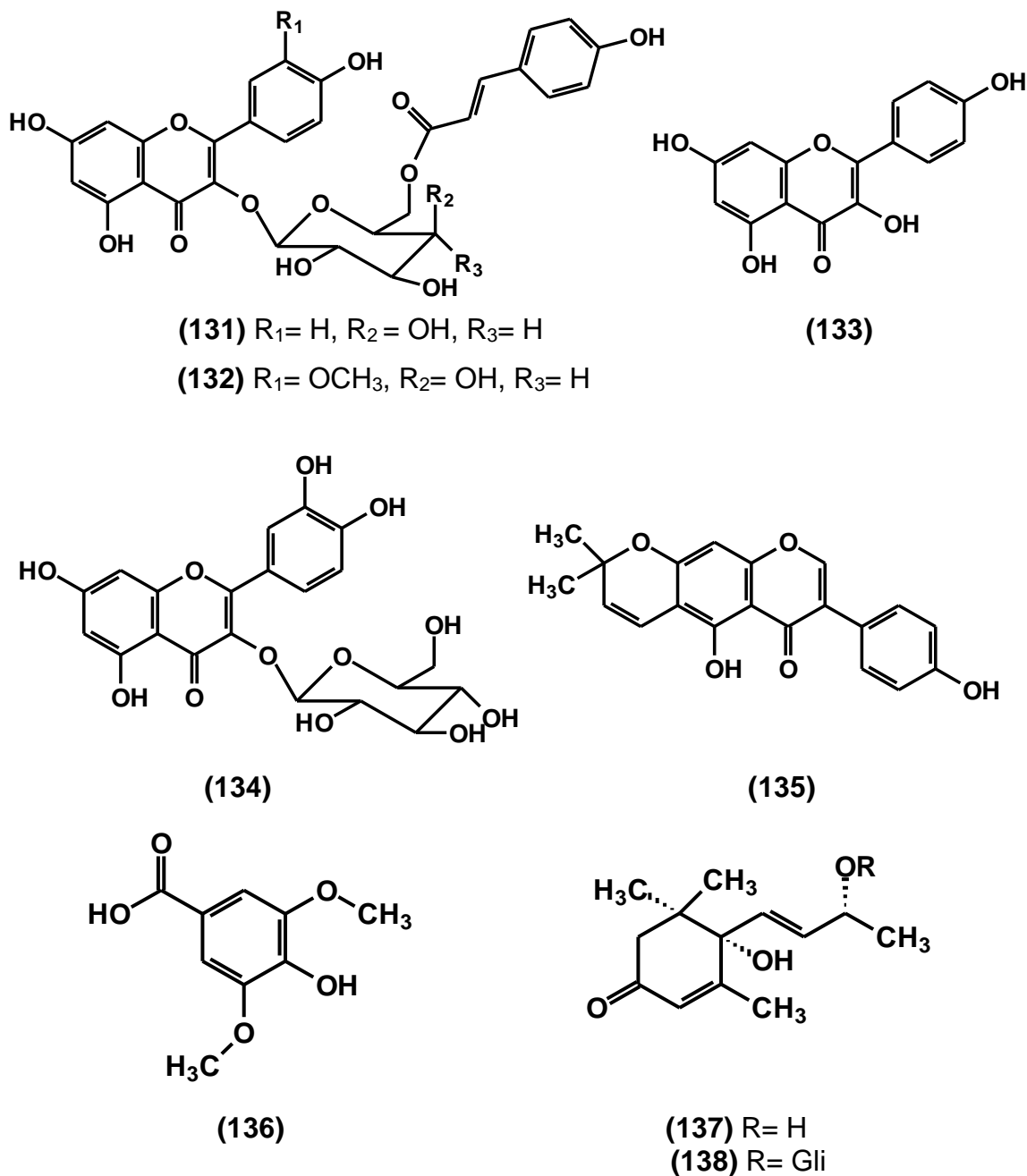
**Figura 18** - Compostos isolados de *C. sellowii*



Lopes *et al.* [64] apresentaram em seu trabalho o resultado obtido da investigação química do extrato etanólico das folhas da espécie *C. pedicellatus*, descrevendo o isolamento e identificação dos flavonoides: tilirosídeo **(129)**, já isolado de *C. sellowii* [65], 6"-*O-p* coumaroil- $\beta$ -galactopiranosilcanferol **(131)**, canferol-6"-*O-p*-cumaroil- $\beta$ -glicopiranosil-3'metoxi **(132)**, canferol **(133)**, quercetina-3-glicopiranosil **(134)** e alpinumisoflavona **(135)**, bem como o ácido

4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (**136**), o blumenol A (**137**) e o blumenol A glicosídeo (roseosídeo) (**138**) (Figura 19).

**Figura 19** - Compostos isolados de *C. pedicellatus*

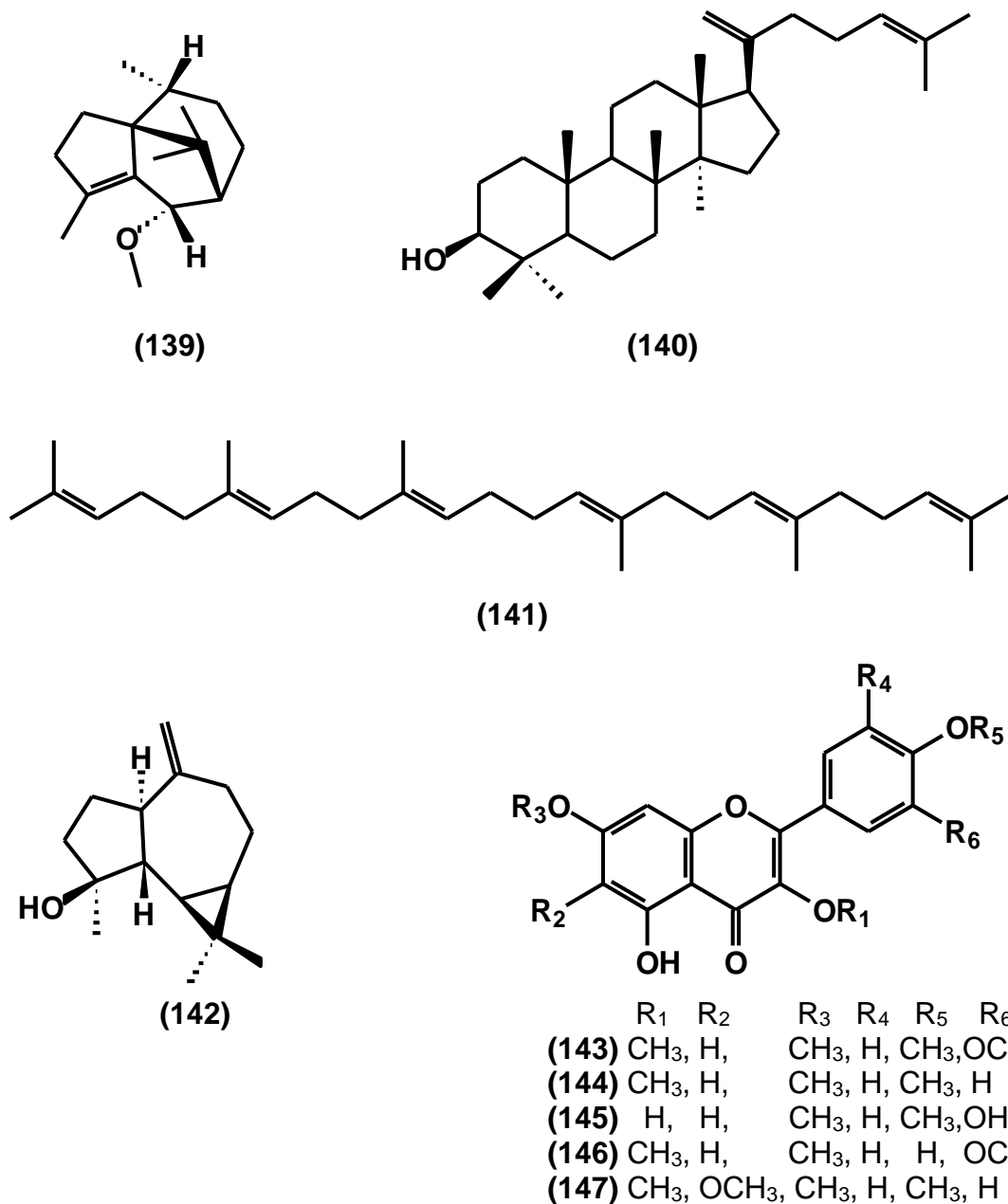


No trabalho desenvolvido por Barreto *et al.* [97] foram isolados das folhas, caules e raízes de *C. muscicarpa* Müll. Arg., o sesquiterpeno, 6 $\alpha$ -metoxicipereno (**139**), quatro terpenóides, damaradienol (**140**), esqualeno (**141**), ácido acetil aleuritólico (**24**) e espatulenol (**142**); e oito flavonoides, artemetina (**125**), canferol (**133**), casticina (**127**), 5-hidroxi-3,6,7,4'-



tetrametoxiflavona (**147**), retusina (**143**), 3,7,4'-trimetoxicanferol (**144**), ombuina (**145**) e pachipodol (**146**) (Figura 20).

**Figura 20** - Compostos isolados de *C. muscicarpa*



As classes de compostos comumente encontradas no gênero *Croton* são os terpenóides e os flavonoides. Considerando que durante este trabalho foi possível o isolamento de derivados de flavonoides, no próximo tópico será abordado um pouco dos aspectos gerais, classificação e a biossíntese desta classe de metabólitos secundários. O interesse pelo estudo desta classe de

substâncias naturais vem crescendo significativamente, principalmente após a descoberta de uma série de efeitos benéficos à saúde humana [98].

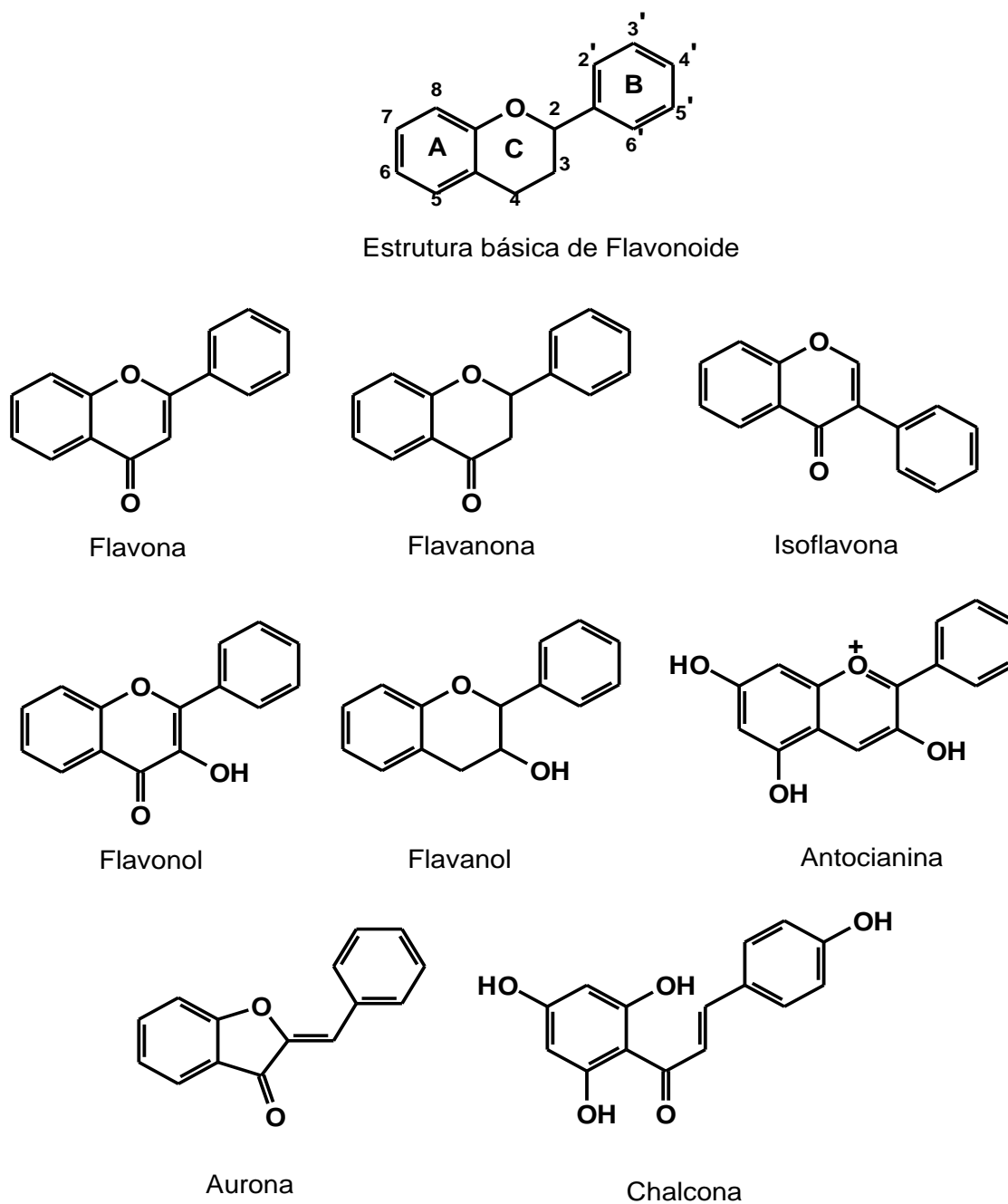
## 2.3 Os Flavonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários, da classe dos polifenóis, os quais possuem baixa massa molecular e são encontrados em diversas espécies de vegetais. Os diferentes tipos de flavonoides podem ser obtidos a partir de várias partes dos vegetais como nas flores e frutas.

Apresentam estrutura fenólica variável, que possui um esqueleto formado por 15 átomos de carbono  $C_6-C_3-C_6$  constituído por dois anéis benzênicos (A e B), ligados por meio de uma cadeia de três carbonos que pode estar aberta (dihidrochalconas e chalconas) ou formando a estrutura heterocíclica central, o anel pirano (anel C), como nos casos de auronas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianinas e antocianidinas, flavonóis e flavanóis (Figura 21) [99-102].

Na natureza pode-se encontrar flavonoides com vários tipos de substituição, como metiladas, metoxiladas, preniladas, hidroxiladas e glicosiladas, sendo esta última muito comum em plantas. Esses padrões geram uma grande complexidade e diversidade na estrutura dos flavonoides, como por exemplo as antocianinas em que sua cor é determinada pelo padrão de glicosilação [103].

**Figura 21** - Estrutura fundamental dos flavonoides e de suas principais sub-classes [102]



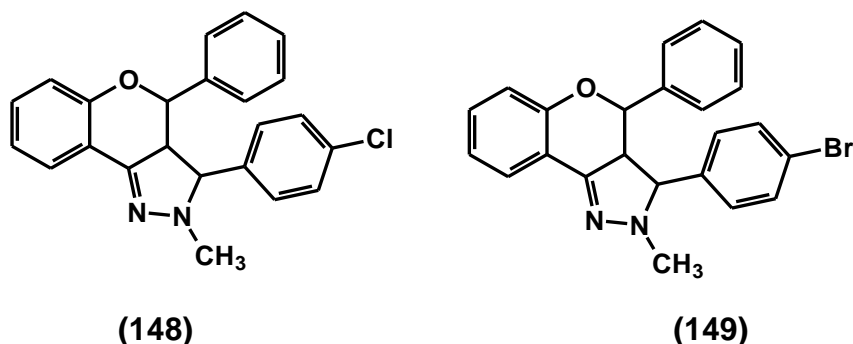
Na natureza, os flavonoides têm uma importante função que é a de ser responsáveis pela pigmentação em frutas, flores, sementes e folhas. O excesso de flavonoides nas plantas está associado às suas importantes funções biológicas, como a de proteção contra raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias. Atuam também atraindo polinizadores e disseminadores de sementes, além de possuir importantes propriedades

farmacológicas como: antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante e antimicrobiana [98, 101, 104, 105].

Os flavonoides são componentes muito importantes no tratamento de muitas doenças devido ao seu potencial antioxidante. Estudos mostram que o consumo regular desses compostos está relacionado a diminuição do estresse oxidativo e, por consequência, defendem o organismo humano de doenças como o Alzheimer, arteriosclerose, câncer e o envelhecimento. Assim, acredita-se que os flavonoides por atuarem como antioxidantes formam radicais estáveis e protegem os organismos vivos contra os danos dos radicais livres [106, 107].

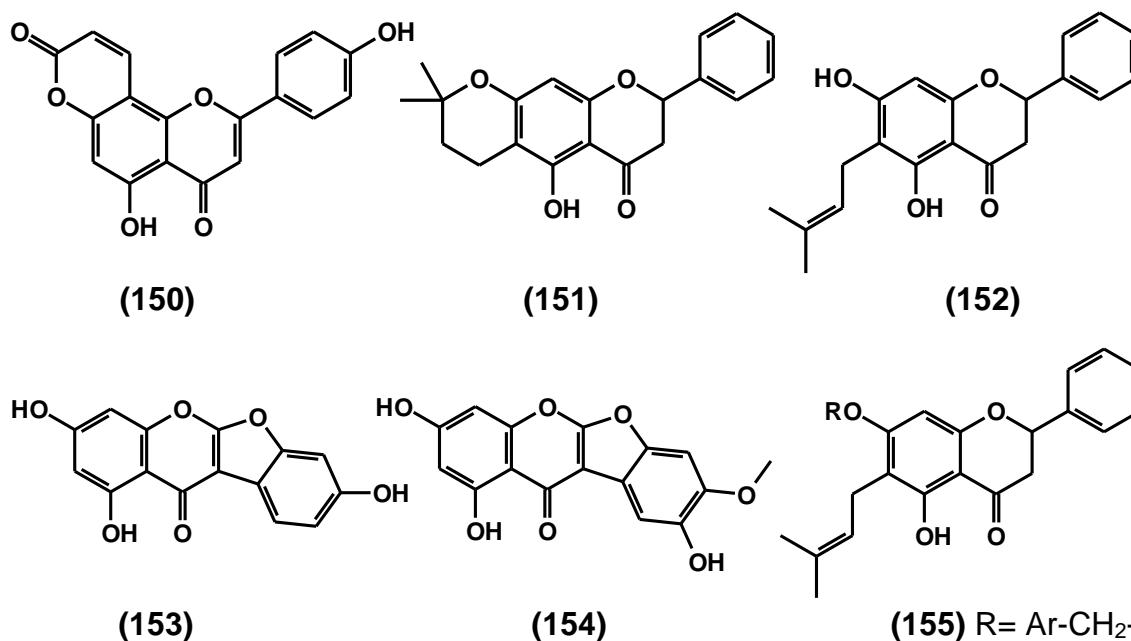
O atual tratamento contra o câncer baseia-se predominantemente em drogas citotóxicas. Assim, diversas estratégias têm sido empregadas para o desenvolvimento de novos medicamentos. Estudos mostraram que uma série de híbridos da flavanona-2-pirazolina, que contém um anel de pirazol condensado com 3- arilidenoflavanonas, especificamente a 3-(4-clorobenzilideno)-flavanona **(148)** e 3-(4-bromobenzilideno)-flavanona **(149)** (Figura 22), exibiram forte citotoxicidade contra linhagens celulares de leucemia promielocítica humana (HL-60), sendo reconhecida a importância de compostos heterocíclicos na descoberta de novos fármacos [108].

**Figura 22** - Compostos com atividade citotóxica



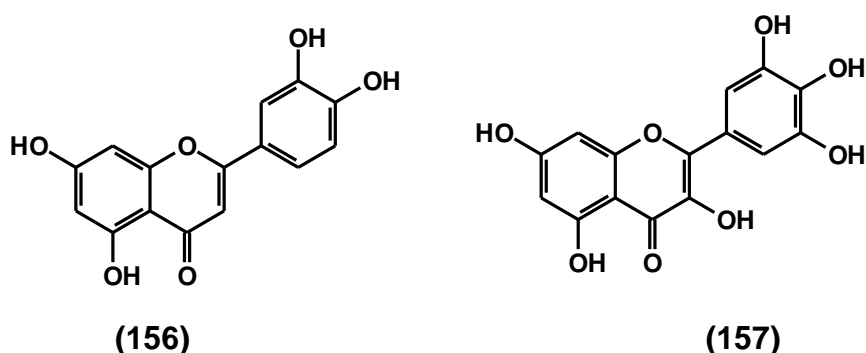
Dzoyem *et al.* [109] relataram um forte efeito citotóxico contra as células Jurkat de seis flavonoides, a pseudarflavona A **(150)**, a 6,7-(2'',2''-dimetilcromano) flavanona **(151)**, a 6-prenilpinocembrina **(152)**, a boeravinona L **(153)**, a desmoxifilina A **(154)** e a 7-benziloxi-6-prenilpinocembrina **(155)** (Figura 23) isolados da *Pseudarthria hookeri* Wight & Arn.

**Figura 23** - Compostos isolados da *Pseudarthria hookeri* com atividade citotóxica



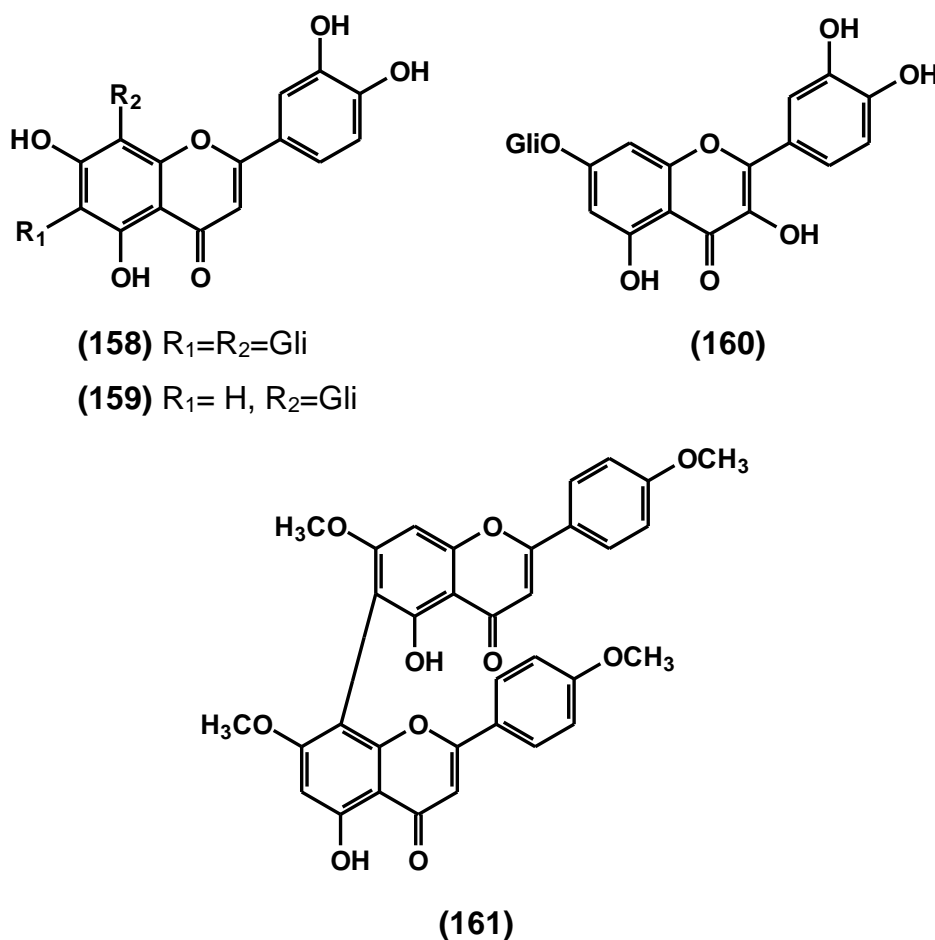
No trabalho desenvolvido por Vukovic *et al.* [110] foi determinada a atividade citotóxica *in vitro* de onze flavonoides isolados do extrato metanólico de propólis frente a linhagem celular de cólon humano HCT-116 (que tem baixa capacidade invasiva) e a linhagem celular de mama humano MDAMB-231 altamente proliferativa. Destes onze, a luteolina (156) e a miricetina (157) (Figura 24) tiveram um efeito citotóxico significativo após 72 horas de tratamento. Com estes estudos, os autores demonstraram que os flavonoides possuem atividade antiproliferativa *in vitro*, mesmo ainda não conseguindo esclarecer quanto à relação da estrutura destes flavonoides e seus efeitos biológicos nestas células.

**Figura 24** - Compostos isolados de propólis com atividade citotóxica



Quatro flavonoides, a luteolina 6,8-di-C- $\beta$ -glicopiranosídeo **(158)**, a luteolina 8-C- $\beta$ -glicosídeo **(159)**, a quercetina 7-O- $\beta$ -glicopiranosídeo **(160)** e a agatisflavona 7,7'',4',4'''-tetra-metil éter **(161)** (Figura 25), isolados do extrato metanólico das partes aéreas de *Erucaria hispanica* (L.) Druce, pertencente a família Brassicaceae, apresentaram atividade citotóxica frente a linhagem celular de carcinoma humano de colo uterino (HELA) [111].

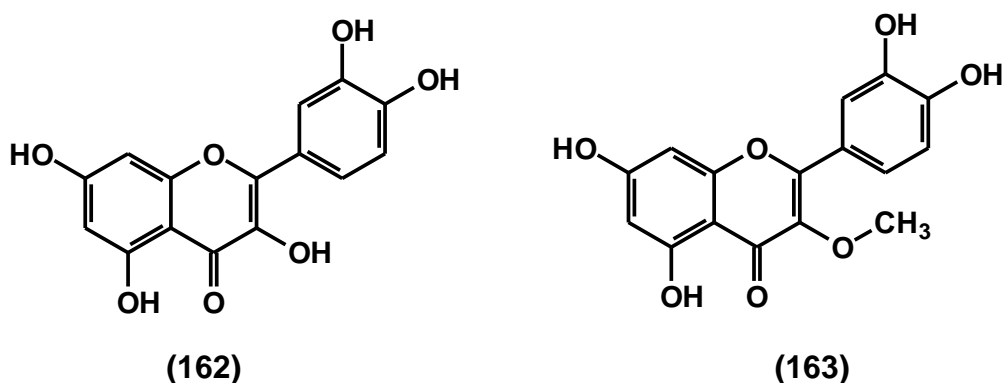
**Figura 25** - Compostos isolados de *Erucaria hispanica* com atividade citotóxica



Estudos realizados por Souza *et al.* [112] revelaram a atividade citotóxica frente as linhagens celulares de gliomas de três flavonoides majoritários identificados no extrato hidroetanólico da espécie *Achyrocline satureioides* (Asteraceae), a luteolina **(156)**, quercetina **(162)** e quercetina-3-O-metil **(163)**. Neste trabalho, o extrato de *A. satureioides* mostrou seletividade na redução da proliferação de células do glioma e indução de apoptose se comparado aos modelos normais do sistema nervoso central testados. Por sua

vez, os compostos puros mostraram efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos a um  $IC_{50}$  de aproximadamente 10  $\mu M$ . O tratamento das células com combinações de flavonoides (1  $\mu M$  em ensaios clonogênico e 5  $\mu M$  em ensaios de viabilidade celular / caspase-3/7) indicaram que estes compostos podem atuar por efeitos aditivos em gliomas, mas são necessários estudos de mecanismos moleculares envolvidos em sua atividade antiproliferativa.

**Figura 26** - Compostos identificados da *Achyrocline satureioides* com atividade citotóxica

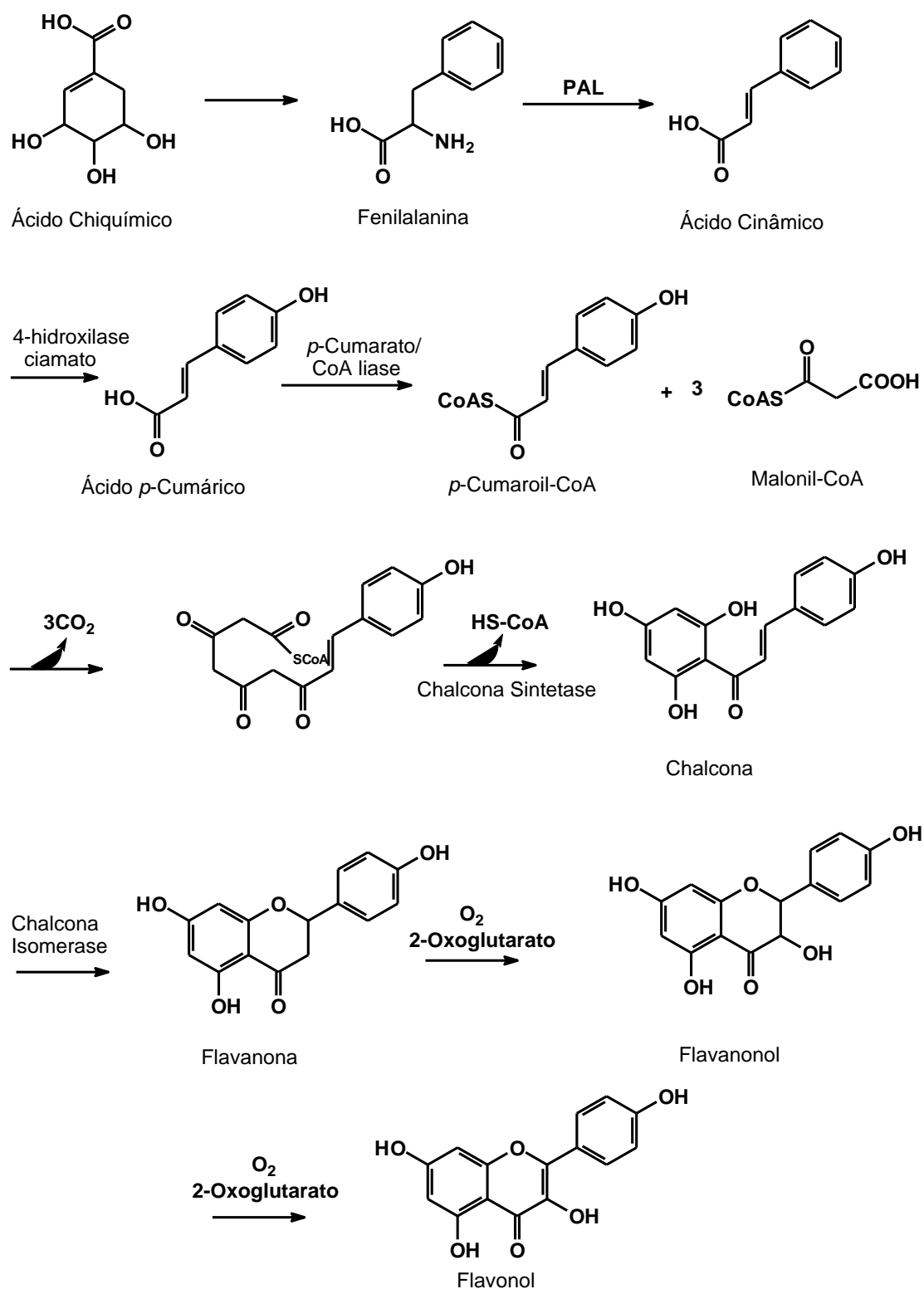


Tendo como base esses e muitos outros estudos relatados na literatura sobre as atividades biológicas de flavonoides é que se pode perceber a importância na investigação dessa classe de compostos para o conhecimento e a relação de suas atividades [113-115].

### 2.3.1 Biossíntese de Flavonoides

Os flavonoides são provenientes de uma rota biossintética mista, sendo que uma parte do esqueleto flavonoídico é o fenilpropanóide (C6-C3) derivado do ácido chiquímico, um importante intermediário na biossíntese de substâncias aromáticas em plantas, e a outra da acetil coenzima A (acetil-CoA) (Figura 27) [100, 101, 104].

**Figura 27 - Biossíntese de Flavonoides [116]**



O ácido chiquímico, precursor inicial da síntese dos flavonoides, produz a fenilalanina, que é um aminoácido, através de uma série de reações



enzimáticas. Inicialmente, o ácido chiquímico sofre uma reação de fosforilação com ATP-dependente produzindo o ácido 3-fosfato chiquímico. Este, por sua vez, combina com a enzima PEP em uma reação de adição-eliminação, catalisada pela enzima EPSP sintase (5-enol-piruvil-chiquímico 3-fosfato), formando o ácido 5-enol-piruvil-chiquímico 3-fosfato (EPSP). O EPSP é, posteriormente, transformado em ácido corísmico através de uma eliminação 1,4 de ácido fosfórico. Por sua vez, o ácido corísmico passa por um rearranjo de Claisen promovido pela enzima corismato mutase produzindo o ácido prefênico [116].

A formação da fenilalanina via ácido prefênico ocorre através de duas reações: a aromatização descarboxilativa e a transaminação. Assim, a aromatização do ácido prefênico produz o ácido fenilpirúvico e a transaminação com a enzima PLP-dependente conduz a formação da fenilalanina. Pela ação da fenilalanina amônio liase (PAL) este aminoácido, por sua vez, é transformado em ácido cinâmico, levando a eliminação da molécula de amônia da cadeia lateral. O ácido cinâmico sofre uma hidroxilação por ação da enzima 4-hidroxilase cinamato produzindo o ácido *p*-cumárico, o qual reage com a coenzima A (CoA), catalisada pelo *p*-cumarato-CoA liase, originando a *p*-cumaroil-CoA. Esta, por sua vez, sofre uma reação de descaboxilação oxidativa com eliminação de três moléculas de CO<sub>2</sub> ao reagir com três moléculas do éster CoA do ácido malônico (malonil-CoA), em que três unidades de C<sub>2</sub> são adicionados via malonato formando um poliacetato [98, 116-118].

Em seguida, ocorre uma reação de condensação de Claisen intramolecular, catalisada pela enzima chalcona sintase, seguido de um equilíbrio ceto enólico formando a chalcona, que é o precursor inicial de toda a classe dos flavonoides. Por fim, um ataque nucleofílico em uma reação do tipo Michael, em que ocorre o ataque do grupo OH a uma cetona  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturada, forma o anel C com a ciclização do anel da chalcona pela ação da enzima chalcona isomerase, gerando a flavanona (naringenina) como o núcleo básico de todos os flavonoides. Esta flavanona, através de uma série de reações enzimáticas como alquilação, oxidação e redução, gera os diversos tipos de flavonoides. Assim, nos flavonoides o anel A é formado via acetil-CoA, o anel B via ácido chiquímico e o anel C deriva do fosfoenolpiruvato, que pode ser um

pirano heterocíclico, como no caso de flavanóis (catequinas) e antocianidinas, ou pirona, como nos flavonóis, flavonas, isoflavonas e flavanonas, que possuem um grupo carbonila na posição C-4 do anel C, compreendendo as principais classes dos flavonoides [98, 116-118].

## 2.4 Espécie *Croton grewioides* Baill.

*Croton grewioides* é exclusiva do semi-árido brasileiro, conhecida popularmente como “canelinha”, “caatinga de cheiro” ou “canelinha-de-cheiro” devido ao aroma exalado por suas folhas. Um levantamento etnobotânico no nordeste do Brasil mostrou que o chá das folhas e galhos dessa espécie tem sido utilizado para o tratamento de gripes, no combate a tosse, febre e cefaleia [119].

Encontrada nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe, regularmente em solos arenosos [62, 68, 120, 121], apresenta porte arbustivo que cresce a uma altura de 1,5 m em vegetação rochosa. Apresenta glândulas acropeciolas, estipitadas e pateliformes e sépalas de ambos os sexos, revestidas por glândulas punctiformes translúcidas, com floração ocorrendo em fevereiro e março e frutificação em abril e maio [62, 67].

A maioria dos estudos químicos desta espécie é baseada em óleos essenciais e em suas atividades biológicas. Figueiredo *et al.* [120] estudaram a bioatividade do óleo essencial de *C. grewioides* no controle da mosca do mediterrâneo (*Ceratitis capitata*). Os resultados deste estudo demonstraram que o óleo aumentou significativamente a mortalidade das pupas.

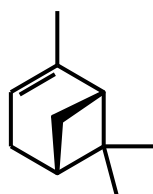
Silva *et al.* [67] realizaram a identificação de 22 componentes químicos do óleo essencial das folhas e dos caules de *C. grewioides* e verificaram a atividade inseticida contra *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). Dos 22 compostos identificados apenas o (*E*)-anetol (65,5% para as folhas e 47,8% para os galhos), o metil eugenol (10,6% para as folhas e 4,6% para os galhos) e o (*E*)-metil isoeugenol (30,0% para os galhos e 4,7% para as folhas) foram encontrados simultaneamente no óleo essencial das folhas e caules. Os resultados para a atividade inseticida revelaram que os óleos essenciais de *C.*

*grewioides* mostraram ser agentes fumigantes, e que poderiam ser usados para o controle da praga.

Silva *et al.* [68] investigaram o potencial toxicológico do extrato etanólico de *C. grewioides*, utilizando modelos comportamentais e farmacológicos *in vivo*. Os resultados foram negativos para toxicidade, apresentando apenas atividade antidiurética em ratos.

O óleo essencial de *C. grewioides* e o principal composto encontrado o  $\alpha$ -pineno (**164**) (Figura 28) foram avaliados frente às linhagens SA-1199B e IS-58 de *Staphylococcus aureus*. Os resultados sugerem que tanto o óleo essencial quanto o  $\alpha$ -pineno são uma fonte de adjuvantes dos antibióticos [122].

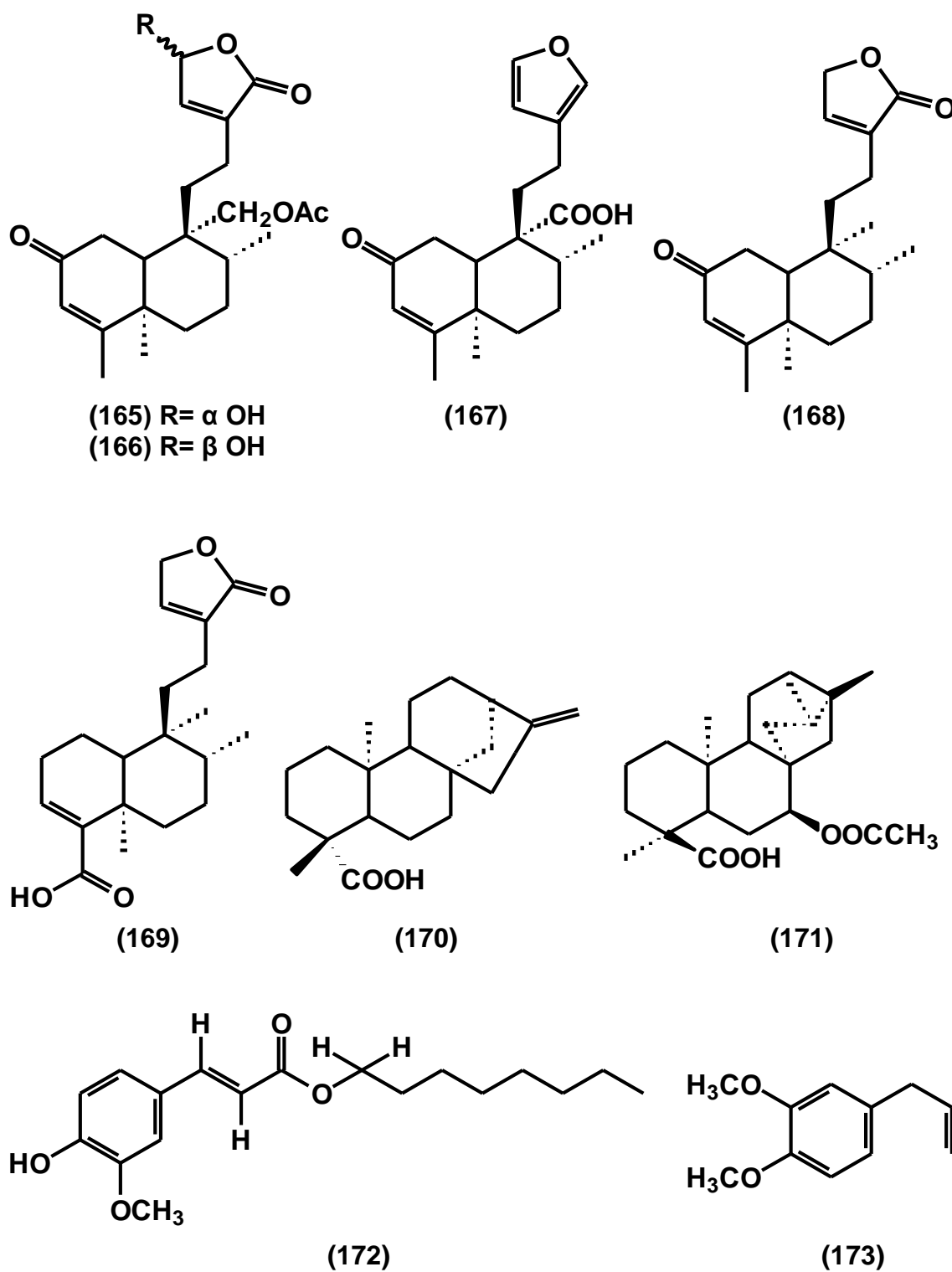
**Figura 28** - Principal composto encontrado no óleo essencial de *C. grewioides*

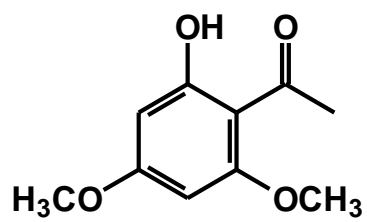


**(164)**

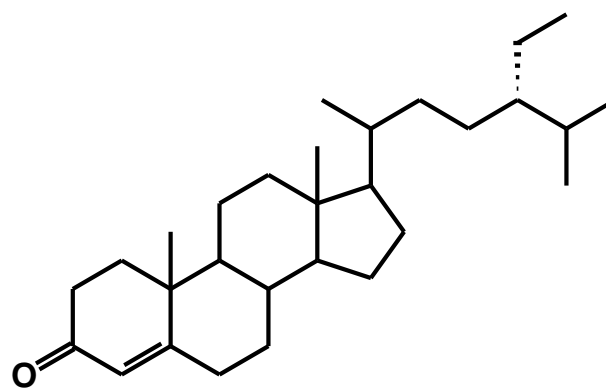
O levantamento bibliográfico exaustivo sobre estudos fitoquímicos de *Croton grewioides* com ênfase nos compostos fixos, foi possível encontrar apenas uma Tese de Doutorado de Viviane Medeiros [66] que descreve o estudo do extrato etanólico desta espécie mostrando o isolamento de nove derivados de diterpenos, a *ent*-2-oxo-cleroda-3,13-dien-15 $\alpha$ ,16-olideo-21-ato (grewiona A) (**165**), *ent*-2-oxo-cleroda-3,13-dien-15 $\beta$ ,16-olideo-21-ato (grewiona B) (**166**), velamona (**15**), velamolona (**16**), ácido grewioico (**167**), 2-oxo-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -cleroda-3,13-dien-15,16-olideo (**168**), ácido patagônico (**169**), ácido caurenoico (ácido *ent*-caur-16-en-19-oico) (**170**) e *ent*-7 $\alpha$ -acetoxitraquiloban-18-oico (**171**); um derivado de esteroide, estigmast-4-en-3-ona (**155**) e três derivados fenólicos, ferulato de octila (**172**), metil eugenol (**173**), 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona (**174**) (Figura 29) [66].

Figura 29 – Compostos isolados de *C. grewioides*





(174)



(175)

Dentro deste contexto, esse trabalho tem como um dos objetivos contribuir para o conhecimento químico dos compostos fixos desta espécie, bem como de seu potencial biológico.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- ❖ Estudar acessos de *Croton grewoides* do ponto de vista químico e farmacológico

#### 3.2 Específicos

- ❖ Estabelecer o perfil cromatográfico dos extratos hidroalcoólico, aquoso e metanólico das folhas de quatro acessos de *Croton grewoides*;
- ❖ Investigar a influência da época de coleta sobre o perfil cromatográfico;
- ❖ Realizar análises quimiométricas dos cromatogramas *fingerprint*;
- ❖ Isolar os constituintes majoritários do extrato aquoso;
- ❖ Identificar os constituintes isolados;
- ❖ Verificar o potencial citotóxico e anticolinesterásico *in vitro* dos extratos e partições a partir dos extratos metanólicos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais e Equipamentos

- ✓ Estufa de circulação forçada - modelo Marconi ML35.
- ✓ Balança analítica - modelo APX-200 da marca Denver Instrument Company.
- ✓ Ultra Freezer – da marca Liotop e geladeira da marca Electrolux.
- ✓ Liofilizador - modelo L101 da marca Liotop.
- ✓ Acetonitrila grau HPLC (Tedia, Fairfield, OH, EUA).
- ✓ Metanol grau HPLC (J.T. Baker, Philipsburg, PA, EUA).
- ✓ Etanol grau HPLC (PanReac, Espanha).
- ✓ Ácido fórmico 88% (v/v) (J.T. Baker, Philipsburg, PA, EUA) de grau analítico.
- ✓ Hexano PA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) de grau analítico.
- ✓ Água deionizada – (Milli-Q, modelo Gradient Millipore, São Paulo, SP, Brasil).
- ✓ Rota evaporador R-3, da marca Buchi, acoplado a uma bomba a vácuo de mesma marca, modelo V-700; com um sistema de refrigeração da marca Microquímica Equipamentos Ltda (modelo MQBTC99-20).
- ✓ Mini centrífuga modelo minispin-plus (marca - Eppendorf AG Hamburg-Alemanha).
- ✓ Ultrasonicador da marca Unique - modelo Ultracleaner1600A.
- ✓ Placa aquecedora Fisatom modelo 752A, Brasil.
- ✓ Cartucho de SPE C<sub>18</sub> com capacidade de 1 mL e 100 mg de adsorvente, da marca J.T. Baker (40 µm APD, 60Å).
- ✓ Bomba a vácuo DIAPUMP® (FANEM, SP, Brasil) acoplada a um manifold a vácuo de 12 portas (Phenomenex).
- ✓ Colunas Cromatográficas: coluna analítica C<sub>18</sub> LUNA® (5 µm, 250 x 4,6 mm, Phenomenex) acoplada a uma coluna guarda; coluna analítica hexil-fenil LUNA® (10 µm, 150 x 4,6 mm, Phenomenex), coluna analítica C<sub>18</sub> KINETEX® (5 µm, 250 x 4,6 mm, Phenomenex) e coluna semipreparativa hexil-fenil LUNA® (10 µm, 250 x 10 mm, Phenomenex).

- ✓ Capilar de sílica fundida (300 x 0,375mm x 100 µm di), tendo a enzima AChE imobilizada covalentemente em sua superfície interna.
- ✓ Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA).
- ✓ Leitora de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).
- ✓ Doxorrubicina (pureza  $\geq 95\%$ , cloridrato de doxorrubicina, Laboratório IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina).
- ✓ Alamar blue (resazurina, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA).
- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA).
- ✓ Enzimas AChE de peixe elétrico, Tipo V-S (Sigma-Aldrich, C2888).
- ✓ Metanol deuterado (99,8% de Deutério, Acros Organics).

## 4.2 Sistemas Cromatográficos

- Cromatógrafo a líquido da marca SHIMADZU (Quioto, Japão), modelo Prominence, composto por: sistema binário de bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A<sub>3R</sub>, coletor de frações FRC-10A, auto injetor SIL-20A, detector espectrofotométrico UV-Vis de comprimento de onda SPD-20A conectado a uma interface CBM-20A e forno de colunas CTO-20A. (**Sistema Semi-preparativo**);
- Cromatógrafo a líquido da marca SHIMADZU (Quioto, Japão), modelo Prominence, composto por: sistema binário de bombas LC-20AT, degaseificador DGU-20A<sub>3</sub>, auto injetor SIL-20AHT, detectores espectrofotométrico UV-Vis com arranjo de diodos SPD-M20A e ELSD conectado a uma interface CBM- 20A e forno de colunas CTO-20A. (**Sistema Analítico**);
- Cromatógrafo líquido Nexera XR equipado com duas bombas de alta pressão modelo LC-20ADXR e LC-20AD, câmara de mistura modelo MR180uLII (volume interno de 180 uL), degaseificador de membrana modelo DGU-20A<sub>3R</sub>, injetor automático SIL-20A, detector



espectrofotométrico com arranjo de diodos SPD-M20A, forno de colunas modelo CTO-20A e uma interface SHIMADZU CBM-20A. O equipamento está acoplado a um espectrômetro de massas Bruker modelo AmaZon Speed com fonte tipo Electrospray Ion Source (ESI), duplo funil de íons e analisador do tipo Ion Trap controlado pelo software Compass 1.7 (**Sistema Nexera XR**).

#### 4.3 Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de 600 MHz na frequência do hidrogênio (14,1 Tesla) da Bruker modelo UltraShield Plus 600, equipado com crioplateforma (cryofit), sonda criogênica com módulo ATMA (Automatic Tunning Matching) de 5 mm e gradiente em Z (CPTCI 1H-13C/15N/D Z-GRD) e unidade de controle de temperatura variável BVT 3000 (BCU 05).

#### 4.4 Material Botânico: Coleta das Folhas e Armazenamento

Quatro acessos da espécie *Croton grewoides* (nomeados de 101, 107, 113 e 126), com cadastro no SisGen nº A8CCB3B, coletados nos municípios de Poço Verde e Poço Redondo, ambos no Estado de Sergipe (Tabela 2), foram cultivados no Campus Experimental, da Universidade Federal de Sergipe, sob a supervisão do Prof. Dr. Arie Fitzgerald Blank, do Laboratório de Culturas de Tecidos Vegetais e Melhoramento Vegetal, do Departamento de Engenharia Agrônômica (DEA). Esses acessos tiveram suas exsiccatas depositadas no Herbário da UFS.

As folhas dos quatro acessos foram coletadas no Campus Experimental no dia 20 de junho de 2016 (inverno) e no dia 24 de janeiro de 2017 (verão) (Figura 30).

**Figura 30** - Foto da espécie *C. grewioides* Baill. [Inverno **(A)** e Verão **(B)**]



Fonte: Vilma M. de Jesus Prado

**Tabela 2-** Dados dos acessos da espécie *C. grewioides*

<b>Acesso</b>	<b>Origem</b> <b>(Município, Estado, País)</b>	<b>Dados</b> <b>georreferenciados</b>	<b>Voucher</b>
<b>101</b>	Poço Verde, Sergipe, Brasil	10°55'17.8"S; 37°06'04.1"W	28256
<b>107</b>	Poço Redondo- Serra da Guia, Sergipe, Brasil	09°58'06.5"S; 37°51'48.4"W	25138
<b>113</b>	Poço Redondo- Serra da Guia, Sergipe, Brasil	09°58'06.9"S; 37°51'49.1"W	28251
<b>126</b>	Poço Redondo- Serra da Guia, Sergipe, Brasil	09°57'55.6"S; 37°51'49.8"W	23259

Após a coleta, a secagem das folhas foi feita por 3 dias em estufa de circulação forçada a 50°C e acondicionadas em frascos de vidro com tampa rosqueável (Figura 31).

**Figura 31-** Folhas secas dos quatro acessos de *C. grewioides* das duas coletas (inverno e verão)



Fonte: Vilma Menezes de Jesus Prado

#### 4.5 Preparação dos Extratos de *Croton grewioides*

Foram preparados os extratos hidroalcoólico, aquoso (chá preparado na forma de decocção) e metanólico das folhas de quatro acessos de *C. grewioides* a partir de duas coletas: inverno e verão.

A preparação do extrato hidroalcoólico foi feito pelo método de maceração, em que 2 g das folhas secas foram deixadas em repouso, por 24 h, em uma mistura de 50 mL de etanol (grau HPLC) e 50 mL de água ultrapura (Milli-Q Gradient Millipore, São Paulo, SP, Brasil) em um erlenmeyer. Após esse tempo foi feita uma filtração simples e o solvente orgânico evaporado em um rotaevaporador à pressão reduzida. A solução aquosa restante foi levada ao congelador e, posteriormente, liofilizada pelo período de 24h sob as seguintes condições: temperatura -54°C e pressão abaixo de 90 µHg.

O extrato aquoso foi obtido pela preparação do chá na forma de decocção. Assim, 200 mL de água ultrapura (Milli-Q Gradient Millipore, São Paulo, SP, Brasil) foram levados a ebulição em um bquer sob uma placa de aquecimento. Neste momento, 2 g de folhas secas foram adicionados ao bquer, deixando sob fervura por mais 1 min e 30 s. Após este tempo, o bquer foi retirado da placa aquecedora e deixado em repouso por 10 minutos para,

em seguida, ser realizada uma filtração simples com papel de filtro. O filtrado foi congelado para ser liofilizado pelo período de 24h sob as seguintes condições: temperatura  $-54^{\circ}\text{C}$  e pressão abaixo de  $90\text{ }\mu\text{Hg}$ .

A preparação do extrato metanólico foi realizada pelo método de maceração, em que 2 g das folhas secas foram deixadas em repouso, por 24 h, em 100 mL de metanol (grau HPLC) em um erlenmeyer. Em seguida, a mistura foi filtrada e o solvente foi eliminado em um evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$ .

Até serem utilizados para as análises, os referidos extratos foram acondicionados em um freezer.

## 4.6 Preparo das Amostras Para Análise Cromatográfica

### 4.6.1 Extração em Fase Sólida (SPE- Solid Phase Extraction)

Os extratos foram submetidos ao processo de *clean-up* (limpeza) por extração em fase sólida (SPE) antes das análises por cromatografia líquida. O extrato metanólico foi utilizado para otimização das condições de análise por apresentar uma coloração esverdeada mais intensa, o que evidenciou uma maior presença de clorofila. O acesso 126 da coleta de inverno foi escolhido para a realização desta otimização por apresentar uma maior quantidade de folhas. Para isso, foram dissolvidos 10 mg do extrato metanólico em 1 mL de metanol, obtendo uma solução na concentração de 10 mg/mL. Os extratos hidroalcoólicos e aquosos foram dissolvidos em 1 mL de 60% de metanol em água e 40% de metanol em água, respectivamente. As soluções foram agitadas por alguns segundos antes de serem centrifugadas a 13300 rpm (11866 força G) por 5 minutos.

Dois procedimentos de *clean-up* desta amostra foram testados, sendo que as frações obtidas foram analisadas por CLAE:

**1º Método:** O cartucho foi condicionado com 1 mL de metanol, seguido de 1 mL de água. Posteriormente, foram aplicados 500  $\mu\text{L}$  da solução do

extrato (10 mg/mL) a qual foi eluída sequencialmente com 1 mL das soluções: 80% MeOH:H<sub>2</sub>O, 90% MeOH:H<sub>2</sub>O e 100% MeOH, gerando três frações.

**2º Método:** O cartucho foi condicionado com 1 mL de metanol, seguido de 1 mL de água. Posteriormente, foram aplicados 500 µL da solução do extrato (10 mg/mL) a qual foi eluída sequencialmente com 1 mL das soluções: 50% MeOH:H<sub>2</sub>O, 80% MeOH:H<sub>2</sub>O e 100% MeOH, gerando três frações.

#### 4.6.2 Condições Analíticas do Perfil Cromatográfico

Para as análises por cromatografia líquida de alta eficiência, foram utilizados dois sistemas de cromatografia: **Sistema Semi-preparativo** e **Sistema Analítico** (seção 4.2). As frações eluídas com 50% MeOH:H<sub>2</sub>O (do **2º Método**) de cada um dos extratos foram transferidos para os *vials* de análise.

A melhor condição de separação cromatográfica foi obtida no Sistema Analítico, utilizando uma coluna analítica Kinetex C<sub>18</sub> (5 µm, 250 x 4,6 mm, Phenomenex) acoplada a uma coluna guarda de mesma fase, temperatura do forno da coluna de 25°C e detecção espectrofotométrica em  $\lambda = 320$  nm. As amostras foram analisadas utilizando um sistema de eluição gradiente em modo reverso, com fase móvel constituída por ACN (B) e solução de ácido fórmico 0,5% (v/v) (A), com a seguinte inclinação: 5 a 15% (B) em 8 min, 15 a 19% (B) em 15 min, 19 a 24% (B) em 10 min, isocrático em 24% por 10 min, 24 a 100% (B) em 15 min, e mantida isocrático em 100% (B) por 10 min. Ao término da corrida cromatográfica foi feito um gradiente de retorno de 100 a 5% em 15 min e o tempo de espera para o acondicionamento da coluna foi de 40 min. A vazão da fase móvel foi de 1 mL/min e em cada análise foram injetados 25 µL da solução, sendo que cada uma das 24 amostras foi analisada em quadruplicata, totalizando 96 análises cromatográficas.

#### 4.7 Análise Quimiométrica

Para avaliar as semelhanças e diferenças entre os perfis cromatográficos, foram aplicadas ferramentas quimiométricas exploratórias, com auxílio

do programa computacional Pirouette (v.4.0, Infometrix, EUA). Antes, porém, foi necessário o pré-tratamento dos dados (alinhamento dos picos) utilizando o algoritmo *Correlation Optimised Warping* (COW) [123] e posterior pré-processamento (centrado na média) dos dados originais. O pré-tratamento dos dados foi realizado com o programa computacional Matlab (versão 2009a, The MathWorks, Natick, MA, EUA).

Essa análise foi realizada pelo Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

#### **4.8 Isolamento por Cromatografia Líquida Semi-preparativa de Compostos a Partir do Extrato Aquoso do Acesso 107 (coleta de verão) de *C. grewioides* e Identificação Estrutural**

Para o isolamento dos constituintes químicos de *C. grewioides* foi utilizado uma solução do extrato aquoso, preparado por decocção do acesso 107 da coleta de verão, dissolvendo-se 60 mg em 1mL de uma mistura contendo 40% de metanol em água deionizada, resultando numa concentração de 60 mg/mL. Em seguida a solução foi submetida a centrifugação em 13300 rpm (11866 força G) durante 5 min e transferido para o *vial* de análise.

Após algumas otimizações a melhor condição de separação cromatográfica foi obtida em um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu, Sistema Semipreparativo (seção 4.2), utilizando uma coluna semipreparativa hexil-fenil LUNA® (10 µm, 250 x 10 mm, Phenomenex), mantida a uma temperatura de 25°C e detecção espectrofotométrica em  $\lambda = 320$  nm. A separação foi feita utilizando um sistema de eluição gradiente em modo reverso, com fase móvel constituída por ACN (B) e solução de ácido fórmico 0,5% (v/v) (A), com a seguinte inclinação: 5 a 28% (B) em 15 min, 18 a 37% (B) em 10 min, 37 a 60% (B) em 15 min, 60 a 100% (B) em 5 min, e mantida isocrático em 100% (B) por 10 min. Ao término da corrida cromatográfica foi feito um gradiente de retorno de 100 a 5% em 15 min e o tempo de espera para o condicionamento da coluna foi de 25 min. A vazão da fase móvel foi de 4,0 mL/min e o volume de injeção de 300 µL, sendo realizada um total de 35

injeções para o isolamento. Para a aquisição dos dados foi utilizado o *software* LC solution.

A determinação estrutural dos compostos isolados foi feita a partir dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni e bidimensionais [RMN  $^1\text{H}$ , Carbono-13, COSY, HSQC e HMBC (seção 4.3)], realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da UFSCar (DQ-UFSCar), sob a supervisão do Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira.

#### 4.9 Atividade Citotóxica

Para a realização dos testes antitumorais, os extratos foram diluídos em DMSO puro estéril na concentração de 10 mg/mL e testados na concentração única de 50  $\mu\text{g/mL}$ .

Foram utilizadas células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana) doadas pelo Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil, as quais foram cultivadas em frascos para cultura de células (75  $\text{cm}^3$ , volume de 250 mL). Os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células desprendessem das paredes dos frascos. As culturas de células apresentaram-se negativas para micoplasma.

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos, o ensaio do Alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com os compostos testes.

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (100  $\mu\text{L}$ /poço de uma solução de  $0,3 \times 10^6$  células/mL para células em suspensão e  $0,7 \times 10^5$  células/mL para células aderidas). Após 24 horas de incubação, as amostras testes, dissolvidas em DMSO, foram adicionadas em cada poço e incubadas por 72 horas. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo na

concentração única de 25 µg/mL, enquanto o controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de Alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa [124]. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

Os ensaios de atividades antitumorais foram realizados sob a supervisão do Professor Dr. Daniel Pereira Bezerra, da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ- Bahia.

#### 4.10 Atividade Anticolinesterásica

Para a realização dos ensaios de inibição enzimática, as amostras foram submetidas à triagem de inibição pontual (uma única concentração testada) para a enzima acetilcolinesterase isoforma de peixe elétrico ( $_{eel}$ AChE). Para isso, foram utilizadas as enzimas AChE (de peixe elétrico, Tipo VI-S) (Sigma-Aldrich, C2888) imobilizadas covalentemente em capilar de sílica fundida (30 cm x 0,375mm x 100 µm d.i.) sendo denominadas ICER-AChE $_{eel}$  [47, 125, 126].

No processo de imobilização foi utilizada uma solução contendo 2 unidades de enzima para 1 mL, sendo o valor de  $K_{mapp}$  (70 µM), a constante de Michaelis-Menten (concentração do substrato ACh onde se obtém uma velocidade inicial de reação igual à metade da velocidade máxima de catálise enzimática), determinado utilizando concentrações crescentes do substrato acetilcolina (0,25 a 150 µM). Assim, para a realização dos ensaios de inibição foi utilizada ACh na concentração de 70 µM.

O ICER-AChE $_{eel}$  foi utilizado como um biorreator enzimático acoplado a um sistema de cromatografia líquida/espectrometria de massas (**Sistema Nexera XR, seção 4.2**) formando um sistema *on-flow* para a realização de ensaios de *screening* de inibidores enzimáticos. Neste sistema a reação enzimática foi monitorada pela quantificação direta do produto da hidrólise enzimática da acetilcolina (ACh) a colina ( $m/z$  104), sendo comparada com atividade da galantamina como inibidor padrão.



Para o *screening* de inibição enzimática pontual foi empregada fase móvel constituída por uma solução de acetato de amônio 15 mM em pH 8,0 na vazão de 0,05 mL/min; utilizando volume de injeção de 10 µL de uma solução contendo 70 µM de ACh e 200 µg/mL de cada extrato avaliado como inibidor. O inibidor padrão (galantamina) foi utilizado na concentração de 100 µM. O ICER-AChE<sub>eel</sub> foi previamente preparado e utilizado para o ensaio anticolinesterásico de acordo com protocolo do Laboratório de Cromatografia de Bioafinidade e Produtos Naturais, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP [47, 125].

Os percentuais de inibição foram obtidos comparando-se a área da banda cromatográfica para a colina considerando a atividade da enzima na presença do inibidor ( $A_i$ ) com a área da banda da colina considerando a atividade da enzima na ausência de inibidor ( $A_0$ ), de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \left[ 1 - \frac{A_i}{A_0} \right] \times 100$$

As soluções estoques (5 mg/mL) de cada amostra testada foram preparadas em solventes adequados de acordo com seu método de obtenção. Amostras preparadas por decocção foram solubilizadas em água ultrapura, as amostras hidroalcoólicas em uma solução hidroalcoólica 1:1 (v/v) metanol/água, as amostras metanólicas (extratos e partições) em metanol e as partições hexânicas, em hexano. A dissolução de cada amostra para o preparo da solução estoque foi auxiliada por ultrassom durante 5 min a temperatura ambiente. Na sequência, cada solução foi centrifugada por 5 min a 10000 rpm (6708 força G). As soluções de trabalho a serem utilizadas (concentração de 2 mg/mL) foram preparadas pela diluição das soluções estoques com água ultrapura.

A partir de cada solução de trabalho dos extratos (2 mg/mL), foram pipetados 10 µL (concentração final 200 µg/mL) e misturados com 20 µL da solução de acetilcolina (concentração final 70 µM) e 70 µL da solução de acetato de amônio 15 mM em pH 8,0. O volume final do meio reacional foi de 100 µL. As soluções foram preparadas em duplicatas e alíquotas de 10 µL foram injetadas no ICER-AChE<sub>eel</sub>.

Entre a análise de cada amostra foi realizado um controle positivo, que consiste na avaliação da atividade enzimática sem o extrato candidato a inibidor, sendo o meio reacional composto por 70 µL da solução de acetato de amônio 15 mM em pH 8,0, 20 µL da solução de ACh e 10 µL de água ultrapura.

Adicionalmente, após o ensaio de cada amostra, foi realizado um controle negativo, que consiste da avaliação de cada extrato na presença da ACh, porém utilizando um reator sem a enzima imobilizada. Esse ensaio é realizado para avaliar a interferência do extrato na hidrólise espontânea da ACh.

Os ensaios de atividades anticolinesterásicas foram realizados sob a supervisão da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Lúcia Cardoso e da Dr<sup>a</sup>. Claudia Seidl, do Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP-Ribeirão Preto.

#### **4.11 Extração Líquido-Líquido dos Extratos Metanólicos de *C. grewioides***

Uma alíquota (40 mg) do extrato metanólico de cada uma das duas coletas (inverno e verão) foi dissolvida em 4 mL de metanol e colocada em um funil de separação. Em seguida, 4 mL de hexano foram adicionados e o funil foi agitado para remover compostos com menor polaridade do extrato metanólico. As duas fases foram drenadas, separadamente, em um frasco limpo de fundo redondo para evaporação do solvente via evaporador rotatório sob pressão reduzida. Esta extração com hexano foi realizada em triplicata, obtendo-se cerca de 10 e 25 mg da partição hexânica e metanólica, respectivamente. Essas duas partições (metanólica e hexânica) foram testadas frente as células tumorais (HepG2 e HL-60) e frente a enzima acetilcolinesterase.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Preparação dos Extratos

Os acessos de *Croton grewioides* Baill. (101, 107, 113 e 126) deste trabalho pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG), da Universidade Federal de Sergipe, onde um dos objetivos é a criação e manutenção da diversidade genética a partir de algumas espécies de plantas para prevenir a perda destes recursos e permitir identificar o acesso mais representativo e/ou mais promissor do ponto de vista farmacológico.

Neste trabalho foram empregados três métodos de extração distintos (hidroalcoólico, aquoso na forma de decocção e metanólico) com o interesse em verificar as diferenças e semelhanças entre eles. Os rendimentos dos extratos obtidos a partir das folhas de quatro acessos de *C. grewioides* (101, 107, 113 e 126), coletadas no inverno e verão, estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Rendimento dos extratos das folhas dos acessos de *C. grewioides*

Acesso	Aquoso		Hidroalcoólico		Metanólico	
	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão
	Massa (mg)	Massa (mg)	Massa (mg)	Massa (mg)	Massa (mg)	Massa (mg)
<b>101</b>	427,9	598,8	265,0	347,4	292,9	528,6
<b>107</b>	445,4	599,7	200,9	249,4	297,5	432,8
<b>113</b>	432,5	596,7	245,5	326,5	276,3	493,7
<b>126</b>	418,3	567,0	226,3	285,5	300,7	458,9

Considerando os extratos obtidos por maceração a frio (metanólico e hidroalcoólico), foi possível verificar que o extrato metanólico apresentou maior rendimento em comparação com o extrato hidroalcoólico.

Além disso, o efeito da sazonalidade em relação à quantidade de massa extraída foi evidenciado nos três métodos de extração, pois os extratos realizados com as folhas coletadas no verão apresentaram maior rendimento em relação aqueles provenientes das folhas coletadas no inverno. Este resultado pode estar relacionado com o aumento na produção de metabólitos secundários pela planta em decorrência de um estresse, ou seja, a intensificação dos raios UV durante o verão [8].

## 5.2 Desenvolvimento dos Cromatogramas *Fingerprint*

### 5.2.1 Otimização das Condições Cromatográficas de Análise por CLAE dos Extratos de *C. grewioides*

Após a coleta do material vegetal, foi iniciado o preparo do extrato hidroalcoólico da coleta de inverno. Com este material foram feitas as primeiras otimizações das condições de análise por cromatografia líquida, enquanto os demais extratos eram preparados, o aquoso e o metanólico.

É importante ressaltar que os testes iniciais (exploratório) e otimizações foram realizados em um cromatógrafo líquido Sistema Semi-preparativo (descrito na seção 4.2), pois o Sistema Analítico (seção 4.2), não estava disponível. As replicatas dos extratos foram realizadas em um cromatógrafo líquido Sistema Analítico (descrito na seção 4.2).

Segundo preconiza Snyder *et al.* [127], ao iniciar a análise de uma amostra desconhecida é aconselhável realizar uma análise cromatográfica utilizando um gradiente exploratório linear de 5 a 100% de ACN:H<sub>2</sub>O em 60 min em uma coluna de fase estacionária C<sub>18</sub> e uma vazão de 2 mL/min de forma a se obter uma visão ampla dos tipos de constituintes químicos que podem estar presentes na amostra.

Para otimização das condições de análise foram avaliados os seguintes fatores: natureza do modificador orgânico (acetonitrila ou metanol), fase estacionária (C<sub>18</sub> ou hexil-fenil) e o uso de água pura ou levemente acidificada com ácido fórmico (0,5%) como componente da fase móvel. As colunas de fase

estacionária C<sub>18</sub> e hexil-fenil foram escolhidas para as análises por serem as únicas disponíveis em nosso laboratório e as mais comuns em análises de extratos de plantas principalmente considerando as classes de metabólitos comumente encontradas em espécies deste gênero.

O acesso 126 do extrato hidroalcoólico (coleta de inverno) foi utilizado para os testes de otimização das condições cromatográficas por ter sido possível a coleta de uma maior quantidade de suas folhas. Vale ressaltar que nessas otimizações não foi necessário o tratamento prévio do extrato por SPE (Extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*) para extração da clorofila, pois este se apresentou com uma coloração amarelada.

Antes de realizar a otimização das condições analíticas a amostra foi submetida ao gradiente exploratório com a vazão da fase móvel de 1,0 mL/min e volume de injeção da amostra de 25 µL (Tabela 4).

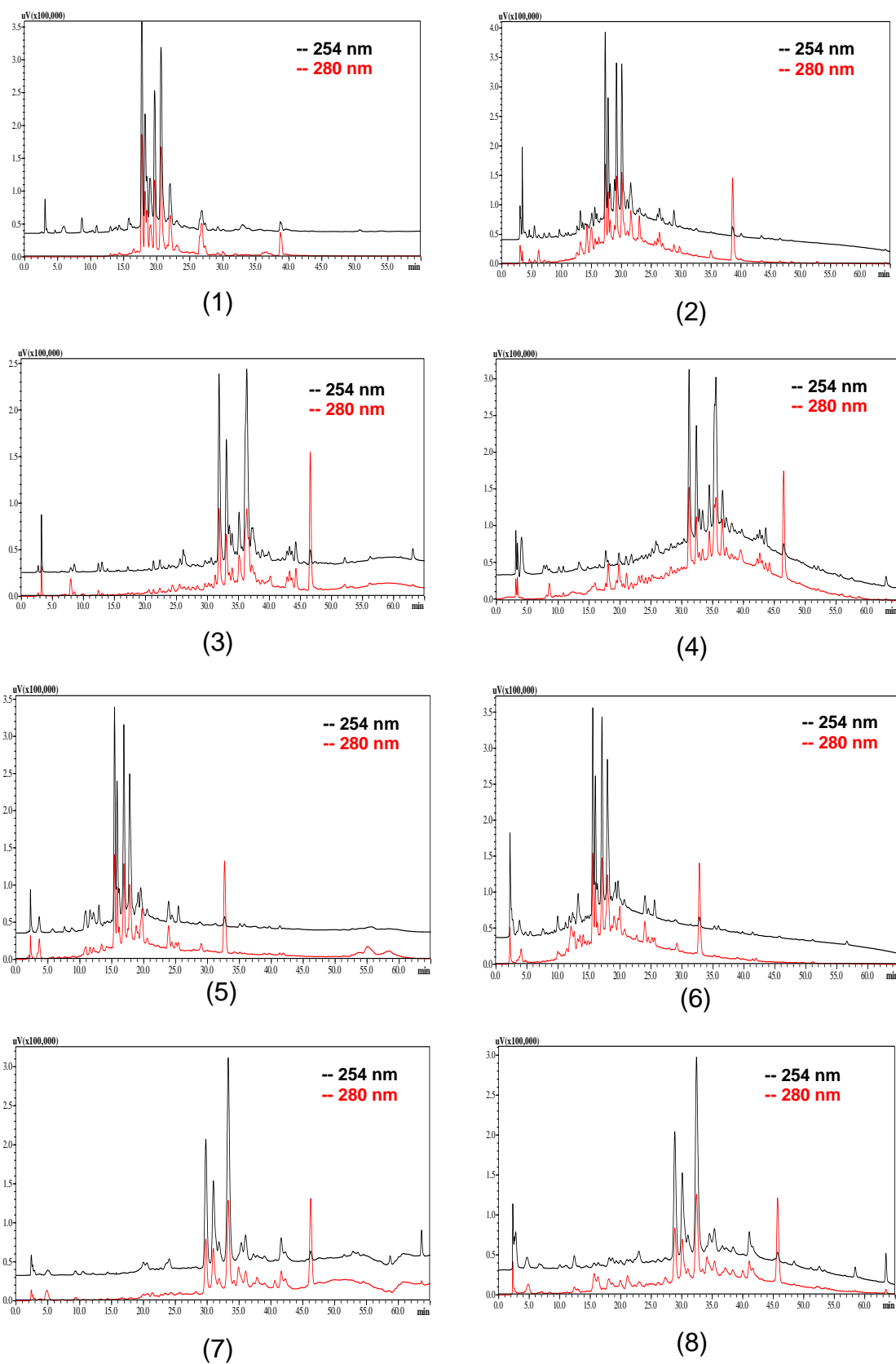
Utilizando as condições descritas no item 4.2, foi possível selecionar os comprimentos de onda 254 e 280 nm, os quais são adequados para detectar as classes de compostos comumente encontradas neste gênero.

**Tabela 4** - Variações analíticas do gradiente exploratório do extrato hidroalcoólico do acesso 126 coleta de inverno

Análise	Fase Móvel	Fase Estacionária	λ (nm)
1	ACN:H <sub>2</sub> O	C <sub>18</sub> Luna	254 e 280
2	ACN:HCOOH(0,5%)	C <sub>18</sub> Luna	254 e 280
3	MeOH:H <sub>2</sub> O	C <sub>18</sub> Luna	254 e 280
4	MeOH:HCOOH(0,5%)	C <sub>18</sub> Luna	254 e 280
5	ACN:H <sub>2</sub> O	Hexil-Fenil	254 e 280
6	ACN:HCOOH(0,5%)	Hexil-Fenil	254 e 280
7	MeOH:H <sub>2</sub> O	Hexil-Fenil	254 e 280
8	MeOH:HCOOH(0,5%)	Hexil-Fenil	254 e 280

Os cromatogramas das oito análises em modo exploratório estão apresentados na Figura 32.

**Figura 32** - Cromatogramas obtidos das condições descritas na Tabela 4 do extrato hidroalcoólico do acesso 126 coleta de inverno



Dos cromatogramas obtidos, foi possível perceber que a utilização do metanol na fase móvel juntamente com a coluna hexil-fenil (condições 7 e 8) não seria uma boa escolha para posteriores otimizações, pois geraram perfis cromatográficos com menor resolução e com um menor número de bandas detectáveis. Conforme evidenciado nos cromatogramas 2, 4 e 6, a utilização da água acidificada na fase móvel proporciona a detecção de um número maior de bandas no início do cromatograma.

Segundo Snyder e Dolan [128], a acetonitrila (ACN) deve ser a primeira alternativa para iniciar os testes de escolha da fase móvel no lugar do metanol, devido à mistura ACN/H<sub>2</sub>O possuir baixa viscosidade, resultando em um maior número de pratos teóricos e em pressões mais baixas na coluna. Assim, destas três condições (2, 4 e 6), a condição 4 foi descartada pois o cromatograma apresentou uma elevação maior da linha de base em relação as outras duas condições (condições 2 e 6). Foi possível verificar que as condições 2 e 6 foram muito semelhantes, porém a condição 2 prevaleceu tomando como referência a melhor resolução das bandas do início do cromatograma e a utilização da fase estacionária C<sub>18</sub>, reforçando as observações de Lanças [129] que considera esta coluna como a primeira escolha para separações em fase reversa, pois mostra-se eficiente para separação de diversas classes de compostos, incluindo derivados fenólicos e insaturados [129].

Caso a otimização desta condição não apresentasse bons resultados, seria possível tentar uma otimização com a condição 6.

A Tabela 5 mostra os testes de otimização realizados a partir da condição 2, utilizando como fase móvel a acetonitrila e água levemente acidificada com 0,5% de ácido fórmico, variando-se a inclinação do gradiente na corrida cromatográfica, com vazão da fase móvel de 1,0 mL/min e volume de injeção da amostra de 25 µL.

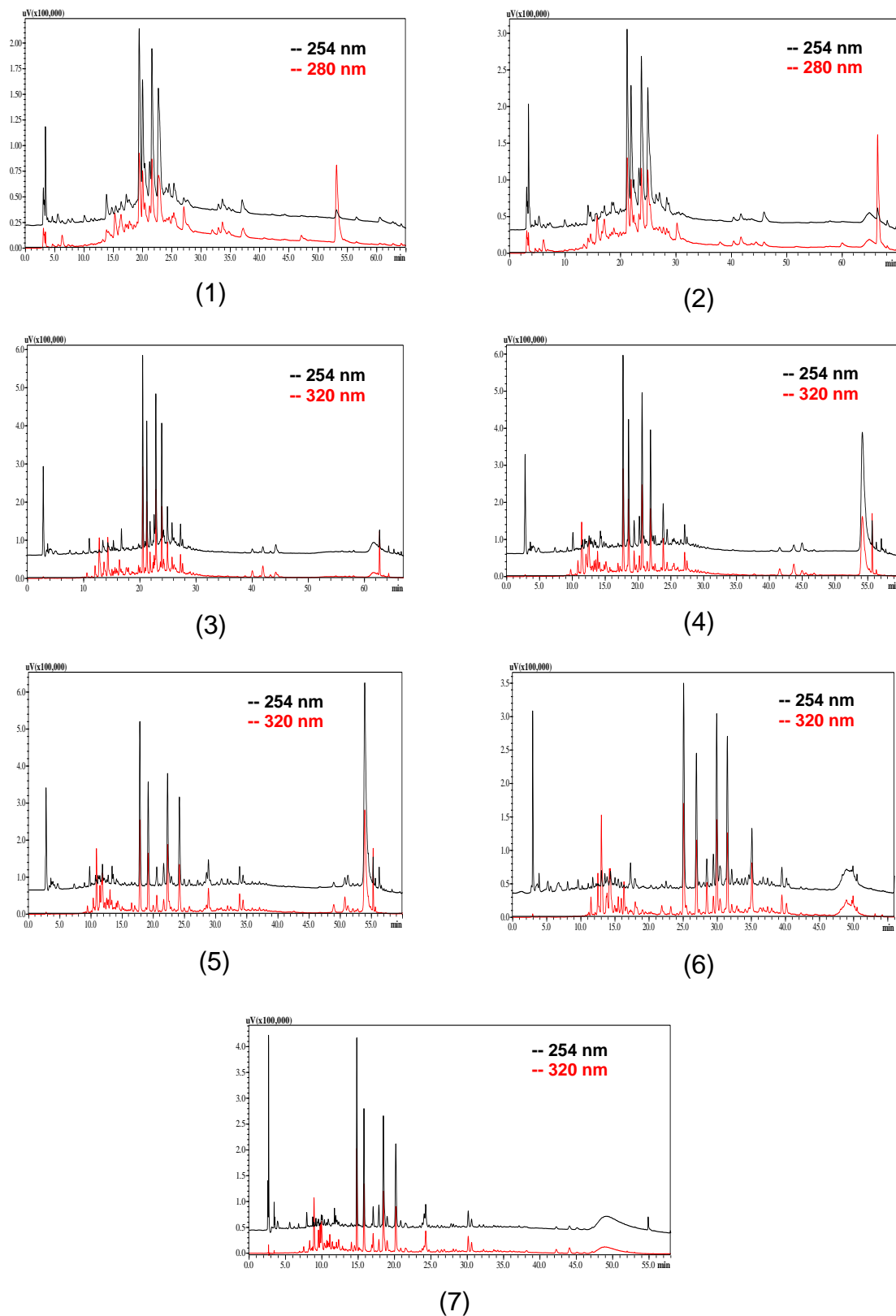
**Tabela 5** - Condições cromatográficas de análise para obtenção do perfil cromatográfico

Análise	Eluição Gradiente(B)	Fase Estacionária	$\Delta$ %B/min	$\lambda$ (nm)
1	1) 5-24% em 15 min 2) 24-42% em 25 min 3) 42-60% em 15 min 4) 60-100% em 10 min	C <sub>18</sub> Luna	1) 1,27 2) 0,72 3) 1,20 4) 4,0	254 e 280
2	1) 5-24% em 18 min 2) 24-29% em 15 min 3) 29-35% em 15 min 4) 35-42% em 10 min 5) 42-56% em 2 min 6) 56-100% em 10 min	C <sub>18</sub> Luna	1) 1,05 2) 0,33 3) 0,4 4) 0,7 5) 7,0 6) 4,4	254 e 280
3	1) 5-24% em 20 min 2) 24-26% em 15 min 3) 26-28% em 10 min 4) 28-31% em 2 min 5) 31-36% em 8 min 6) 36-56% em 2 min 7) 56-100% em 10 min	C <sub>18</sub> Kinetex	1) 0,95 2) 0,13 3) 0,2 4) 1,5 5) 0,63 6) 10,0 7) 4,4	254 e 320
4	1) 5-15% em 7 min 2) 15-24% em 15 min 3) Isocrático em 24% por 10 min 4) 24-26% em 10 min 5) 26-27% em 1 min 6) 27-28% em 5 min 7) 28-69% em 2 min 8) 69-100% em 10 min	C <sub>18</sub> Kinetex	1) 1,43 2) 0,6 3) 0 4) 0,2 5) 1,0 6) 0,2 7) 20,5 8) 3,1	254 e 320
5	1) 5-15% em 6 min 2) 15-19% em 15 min 3) 19-24% em 10 min 4) Isocrático em 24% por 10min 5) 24-26% em 2 min 6) 26-28% em 5 min 7) 28-78% em 2 min 8) 78-100% em 10 min	C <sub>18</sub> Kinetex	1) 1,67 2) 0,27 3) 0,5 4) 0 5) 1,0 6) 0,4 7) 25,0 8) 2,2	254 e 320
6	1) 5-15% em 6 min 2) 15-19% em 15 min 3) 19-24% em 10 min 4) Isocrático em 24% por 10 min 5) 24-100% em 15 min	C <sub>18</sub> Kinetex	1) 1,67 2) 0,27 3) 0,5 4) 0 5) 5,07	254 e 320
7	1) 5-15% em 8 min 2) 15-19% em 15 min 3) 19-24% em 10 min 4) Isocrático em 24% por 10 min 5) 24-100% em 15 min	C <sub>18</sub> Kinetex	1) 1,25 2) 0,27 3) 0,5 4) 0 5) 5,07	254 e 320



Os cromatogramas das sete análises encontram-se na Figura 33.

**Figura 33** - Cromatogramas dos testes de otimização do extrato hidroalcoólico do acesso 126 (inverno) descritos na Tabela 5



A partir da condição escolhida para a otimização do perfil cromatográfico foi percebido que as regiões de alta (tempos de retenção entre 2 e 17 min) e de média polaridade (tempos de retenção entre 17 e 30 min) necessitavam de melhorias na linha de base, na resolução e na largura das bandas objetivando obter um *fingerprint* cromatográfico [11].

Os cromatogramas obtidos pelo uso das condições 1 e 2 apresentaram discreta melhoria em relação ao exploratório. No entanto, foi percebido que ao tentar melhorar a resolução das bandas elas aumentavam sua largura não sendo apropriado para um perfil cromatográfico. Na tentativa de descobrir se o motivo da falta de resolução das bandas foi proveniente de problemas no equipamento, na coluna e/ou da complexidade da amostra, primeiramente foi testada a substituição da coluna por uma mais nova de mesma fase estacionária (C<sub>18</sub> KINETEX®), mesmo tamanho de partícula, comprimento e diâmetro interno, diferindo apenas no tipo de partícula. A coluna LUNA® possui partículas a base de sílica totalmente porosas, enquanto que a KINETEX® possui partículas a base de sílica superficialmente porosas.

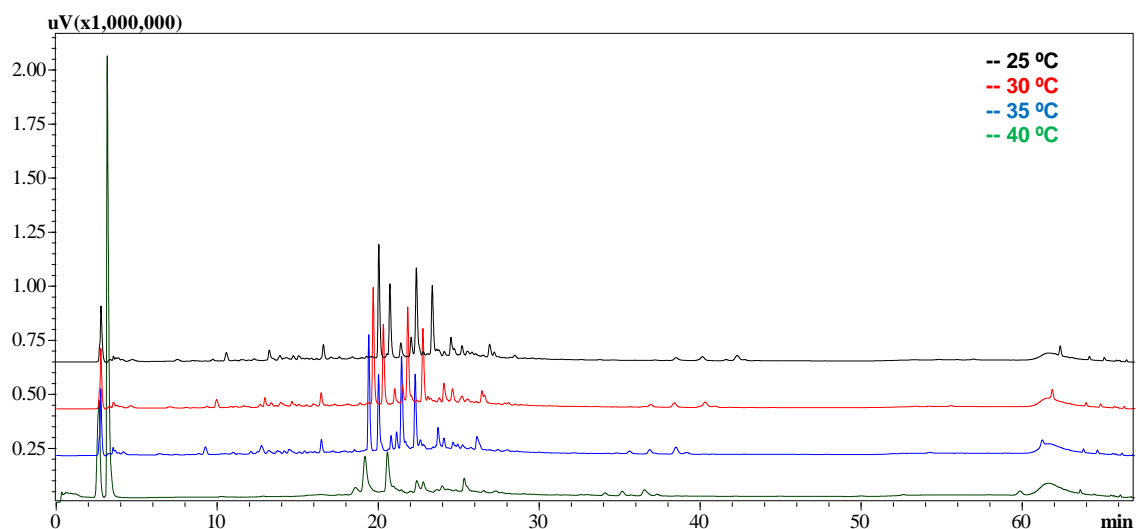
O uso da nova coluna permitiu observar que os perfis cromatográficos (Figura 33) obtidos a partir da condição 3 mostraram melhoria da linha de base, da resolução e largura das bandas. Outros testes foram realizados com o intuito de aumentar a separação das bandas de média polaridade sem aumentar muito o tempo de análise, considerando que as amostras seriam feitas em quadruplicata.

Além da mudança da coluna nas análises com as condições 3 a 7, foi modificado o comprimento de onda de detecção de 280 nm para 320 nm, mantendo o de 254 nm, pois o detector se limitava a dois comprimentos de onda na análise.

Por fim, após alguns testes de otimização das condições de análise, o melhor perfil cromatográfico foi o da condição 7 (Tabela 5 e Seção 4.6.2),

Durante as otimizações, a condição 3 (Tabela 5) foi utilizada para verificar a variação do perfil cromatográfico mudando-se a temperatura da coluna. As temperaturas testadas foram: 25, 30, 35 e 40°C e os cromatogramas obtidos estão representados na Figura 34.

**Figura 34** - Cromatogramas obtidos do extrato hidroalcoólico do acesso 126 (inverno) a partir da condição 3 utilizando quatro temperaturas diferentes (Tabela 4)



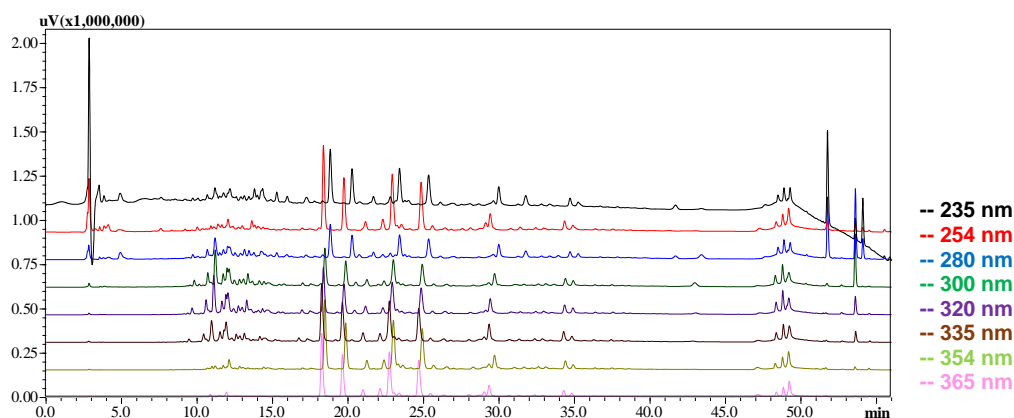
Observando os cromatogramas da Figura 34, foi possível perceber que o aumento da temperatura levou a perda da intensidade da maioria das bandas, no entanto com a intensificação das bandas entre os tempos de retenção 2 a 4 min. Assim, a temperatura de 25°C foi escolhida para a realização das análises posteriores com o objetivo de garantir a estabilidade na temperatura da coluna e sua reprodutibilidade durante as replicatas [130].

Segundo Lanças [130], o aumento da temperatura diminui a viscosidade da fase móvel, permitindo uma redução no tempo de análise sem perda de eficiência da coluna devido a melhoria na transferência de massa entre a fase móvel e a fase estacionária. Além disso, ocasiona uma redução na retenção dos analitos, reduzindo a pressão do sistema e aumentando a eficiência da coluna, ou seja, aumenta o número de pratos teóricos e, consequentemente, leva a uma melhor separação das bandas cromatográficas [130]. Nas análises obtidas não houve melhoria na resolução entre as bandas com o aumento da temperatura. Este resultado pode estar relacionado a algumas limitações do uso de temperaturas mais elevadas durante as análises por cromatografia líquida, tais como o uso de uma fase móvel levemente acidificada e sua relação com a fase estacionária e a classe de compostos presentes na amostra.

Para selecionar o comprimento de onda capaz de detectar o maior número de bandas cromatográficas, foi feita uma varredura selecionando os

valores 235, 254, 280, 300, 320, 335, 354 e 365 nm. Para obtenção desses cromatogramas foram necessárias quatro injeções, pois a cada análise foi possível a seleção de apenas dois comprimentos de onda, devido a utilização do Sistema Semi-Preparativo (seção 4.2). Esta seleção foi feita utilizando a condição 6 da amostra do extrato hidroalcoólico do acesso 126 (coleta de inverno), sendo obtido o cromatograma da Figura 35.

**Figura 35** - Cromatogramas obtidos na condição 6 (Tabela 5) variando os comprimentos de onda do detector



O perfil cromatográfico obtido no comprimento de onda de 320 nm foi o que apresentou um maior número de bandas detectáveis. Desta forma, este comprimento de onda foi escolhido para a obtenção dos cromatogramas *fingerprint*.

### 5.2.2 Otimização do Procedimento de Pré-tratamento (*Clean-up*)

Devido a alta concentração de clorofila nos extratos metanólicos de *C. grewoides* observada pela intensidade da cor esverdeada da solução, foi necessário realizar um pré-tratamento (*clean-up*) utilizando o procedimento de extração em fase sólida (do inglês, *Solid phase extraction*, SPE) antes da análise cromatográfica, pois a presença da clorofila inviabiliza as análises por contaminar a coluna causando o aparecimento de bandas indesejáveis. Assim, para a obtenção do *fingerprint* os extratos hidroalcoólicos e aquosos também

passaram por esta etapa de *clean-up*, a fim de padronizar o procedimento experimental e permitir que seus cromatogramas sejam comparáveis.

Desta forma, foram testados dois métodos de extração em fase sólida conforme descrito no item 4.6.1 (página 57). No primeiro método (Teste 1) foram coletadas três frações denominadas por 80% (MeOH/H<sub>2</sub>O), 90% (MeOH/H<sub>2</sub>O) e 100% MeOH. No segundo método (Teste 2) foram obtidas mais três frações as quais foram denominadas 50% (MeOH/H<sub>2</sub>O), 80% (MeOH/H<sub>2</sub>O) e 100% MeOH.

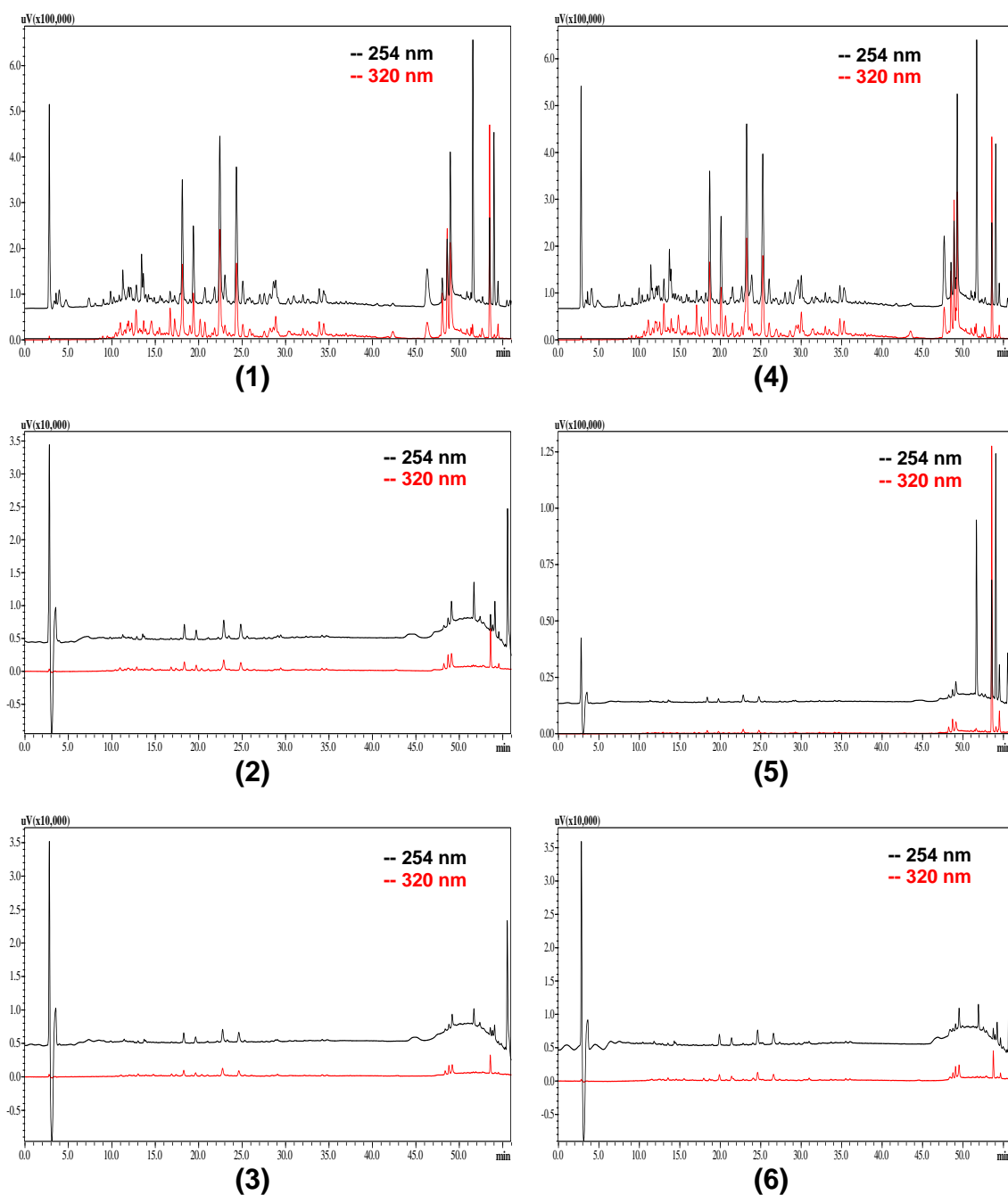
Estas seis frações, oriundas do extrato metanólico do acesso 126 (coleta de inverno), foram analisadas no cromatógrafo líquido, Sistema Semi-preparativo (seção 4.2), utilizando a última otimização (condição 6) nas condições de 5 a 15% (B) em 6 min, 15 a 19% (B) em 15 min, 19 a 24% (B) em 10 min, isocrático em 24% por 10 min, 24 a 100% (B) em 15 min, com fase móvel constituída por ACN (B) e solução de ácido fórmico 0,5% (v/v) (A), em uma coluna analítica C<sub>18</sub> KINETEX® (5 µm, 250 x 4,6 mm, Phenomenex), com vazão de 1mL/min e volume de injeção de 25 µL. Os cromatogramas foram registrados nos comprimentos de onda: 254 e 320 nm, sendo que a melhor detecção foi em 320 nm (Tabela 6).

**Tabela 6** - Condições cromatográficas para obtenção do perfil das diferentes frações em SPE

Análise	Teste	Fração SPE (%)	λ (nm)
1	1	80 (MeOH/H <sub>2</sub> O)	254 e 320
2	1	90 (MeOH/H <sub>2</sub> O)	254 e 320
3	1	100 (MeOH)	254 e 320
4	2	50 (MeOH/H <sub>2</sub> O)	254 e 320
5	2	80 (MeOH/H <sub>2</sub> O)	254 e 320
6	2	100 (MeOH)	254 e 320

Na Figura 36 estão apresentados os cromatogramas das análises das frações dos testes 1 e 2 (Tabela 6).

**Figura 36** - Cromatogramas obtidos das frações dos testes 1 e 2 (Tabela 6)



Os cromatogramas da Figura 36 evidenciaram que os compostos do extrato foram em sua maioria eluídos com a passagem da primeira solução em ambos os testes, a mistura 80% (MeOH/H<sub>2</sub>O) no teste 1 (cromatograma 1) e a mistura 50% (MeOH/H<sub>2</sub>O) no teste 2 (cromatograma 4), apresentando semelhança entre eles. No entanto, houve uma pequena melhoria na resolução das bandas na região de 30 minutos no cromatograma 4, sendo este o

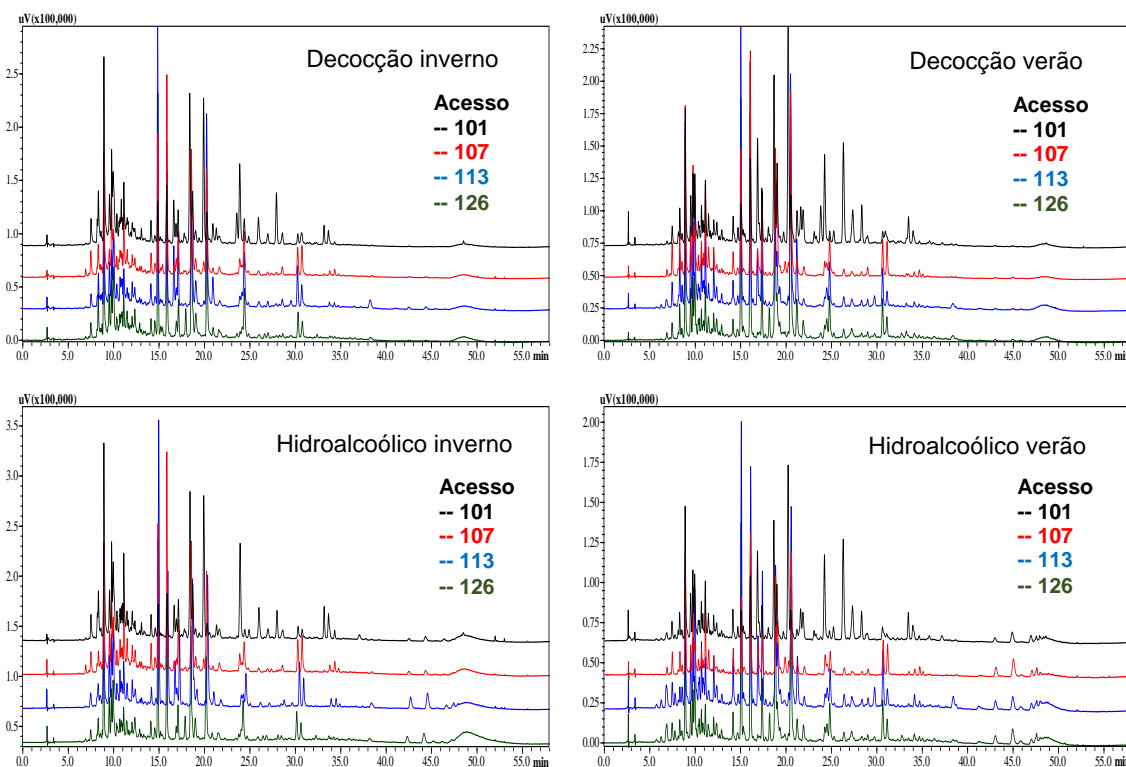
selecionado para o pré-tratamento de cada uma das replicatas das amostras antes da análise cromatográfica.

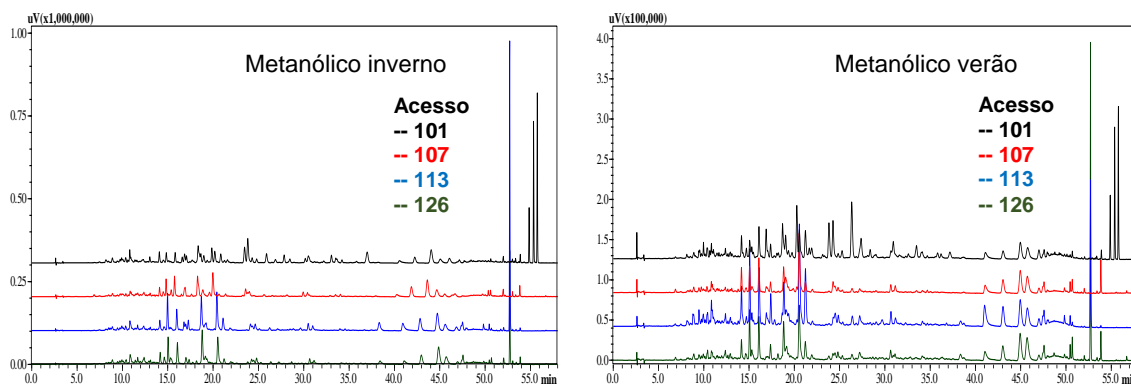
### 5.2.3 Aplicação da Condição Cromatográfica na Análise de Diferentes Acessos de *Croton grewoides*

Até esta etapa do trabalho, as análises foram realizadas no cromatógrafo do Sistema Semi-preparativo. Os cromatogramas *fingerprints* foram obtidos no cromatógrafo do Sistema Analítico, utilizando a condição 7 da Tabela 5.

Para fins de comparação do perfil cromatográfico entre os acessos, os cromatogramas foram plotados considerando os métodos de extração e as épocas de coleta (Figura 37).

**Figura 37** - Cromatogramas de quatro acessos dos três tipos de extração e das duas coletas

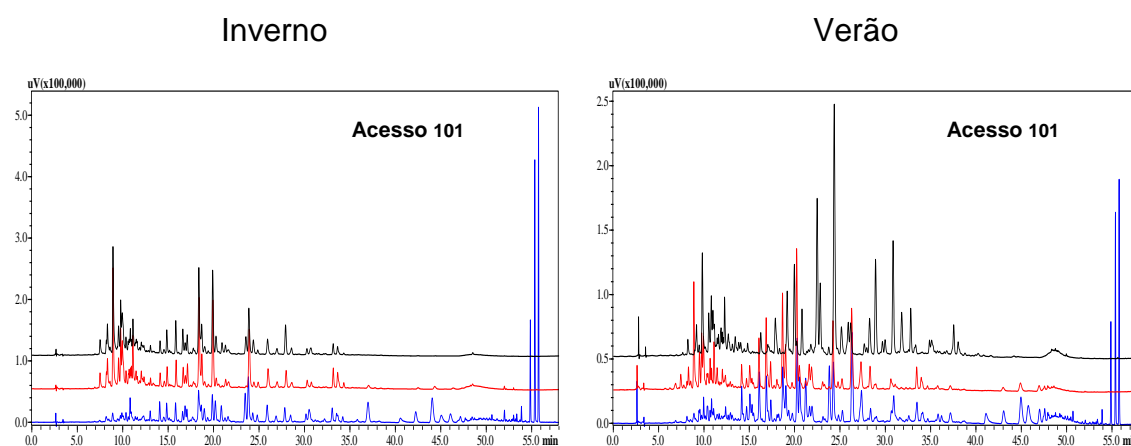




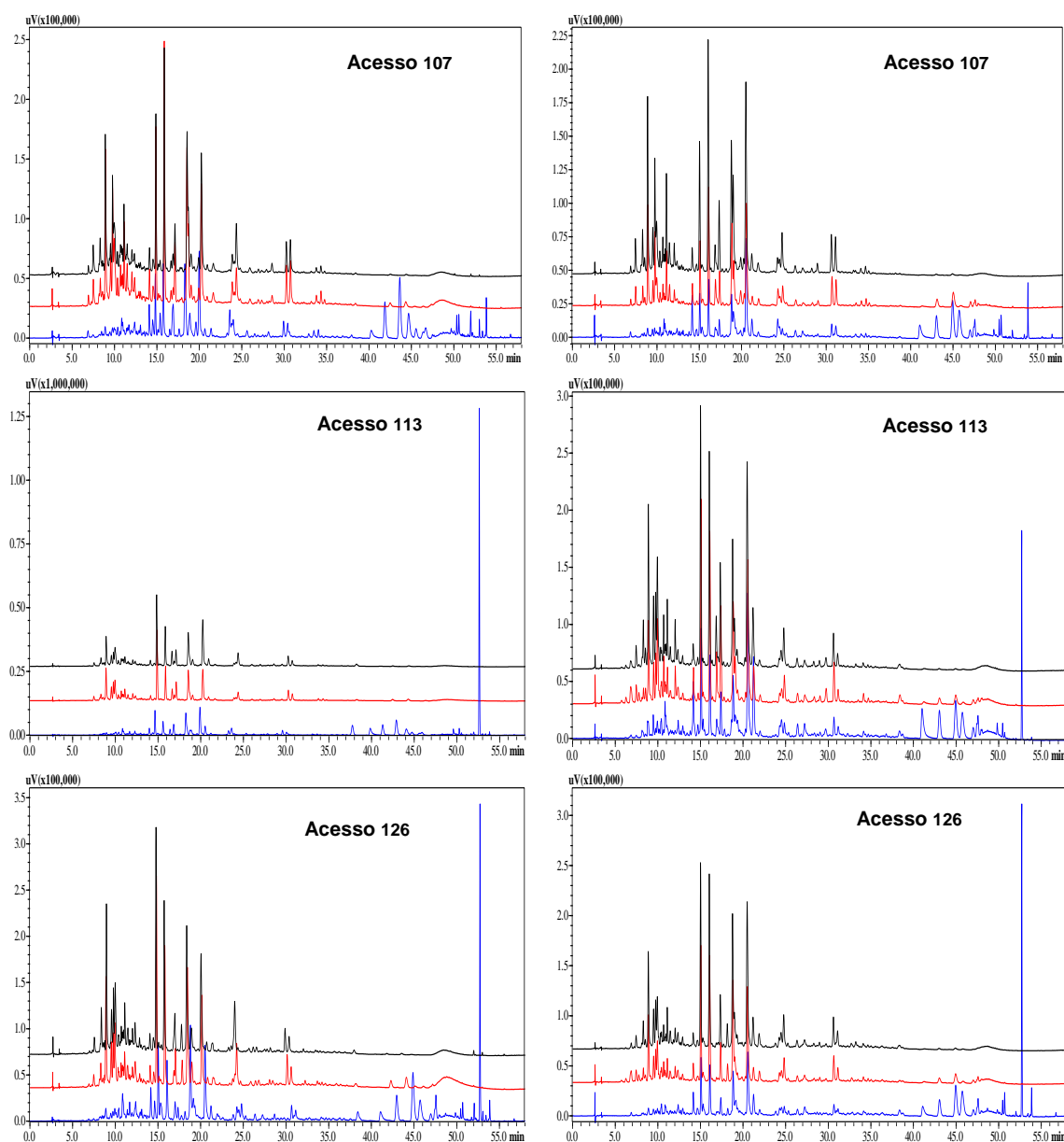
Observando a Figura 37, foi possível verificar as semelhanças dos perfis cromatográficos entre os extratos aquosos e hidroalcoólicos, diferenciando do extrato metanólico, porém essas semelhanças e diferenças serão melhor analisadas com a utilização de ferramentas quimiométricas como as análises de componentes principais. Além disso, o método desenvolvido apresentou ser apropriado para obtenção do perfil cromatográfico de todos os extratos.

Para avaliar o efeito do método de extração e da época de coleta no perfil cromatográfico para cada acesso, na Figura 38 estão plotados os respectivos cromatogramas sobrepostos.

**Figura 38** - Cromatogramas comparando cada acesso nas diferentes extrações (decoção - preto, hidroalcoólico - vermelho e metanólico - azul)





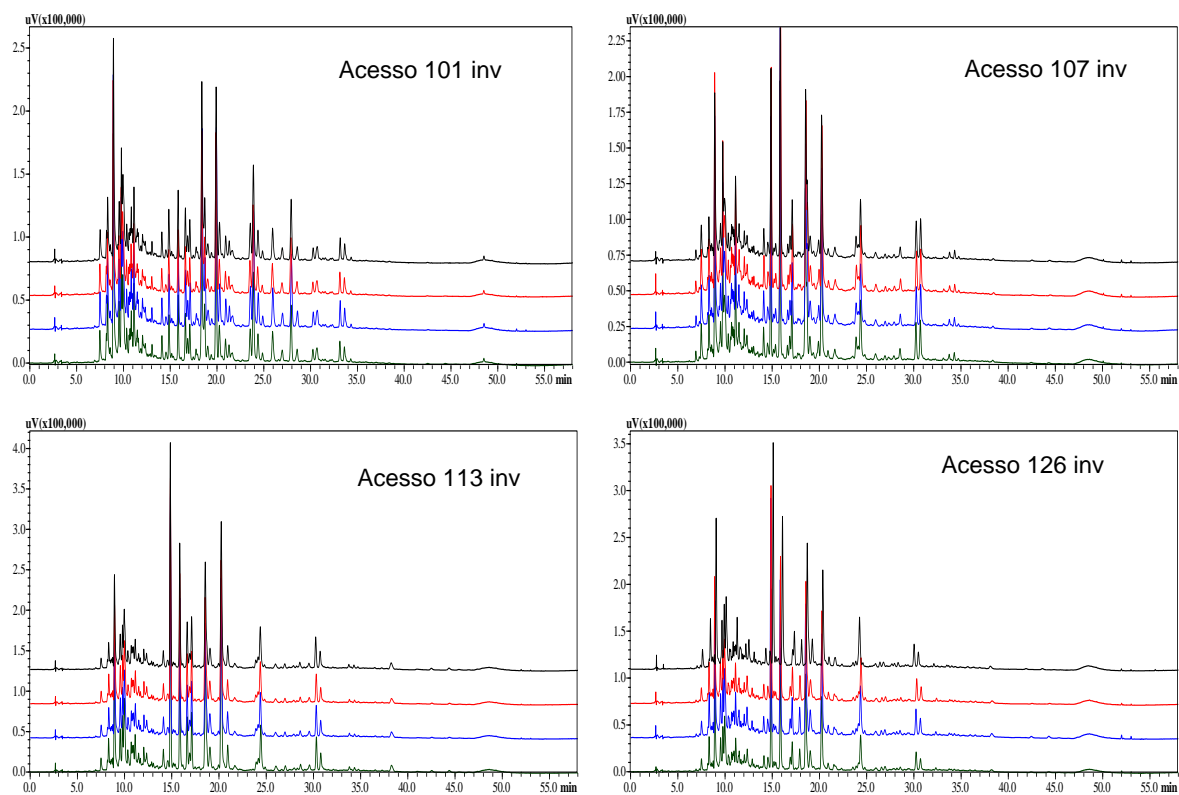


Observando a Figura 38, é possível verificar que, independentemente do acesso, há uma semelhança entre os perfis cromatográficos dos extratos aquosos e hidroalcoólicos o que não é perceptível quando comparados aos seus respectivos extratos metanólicos.

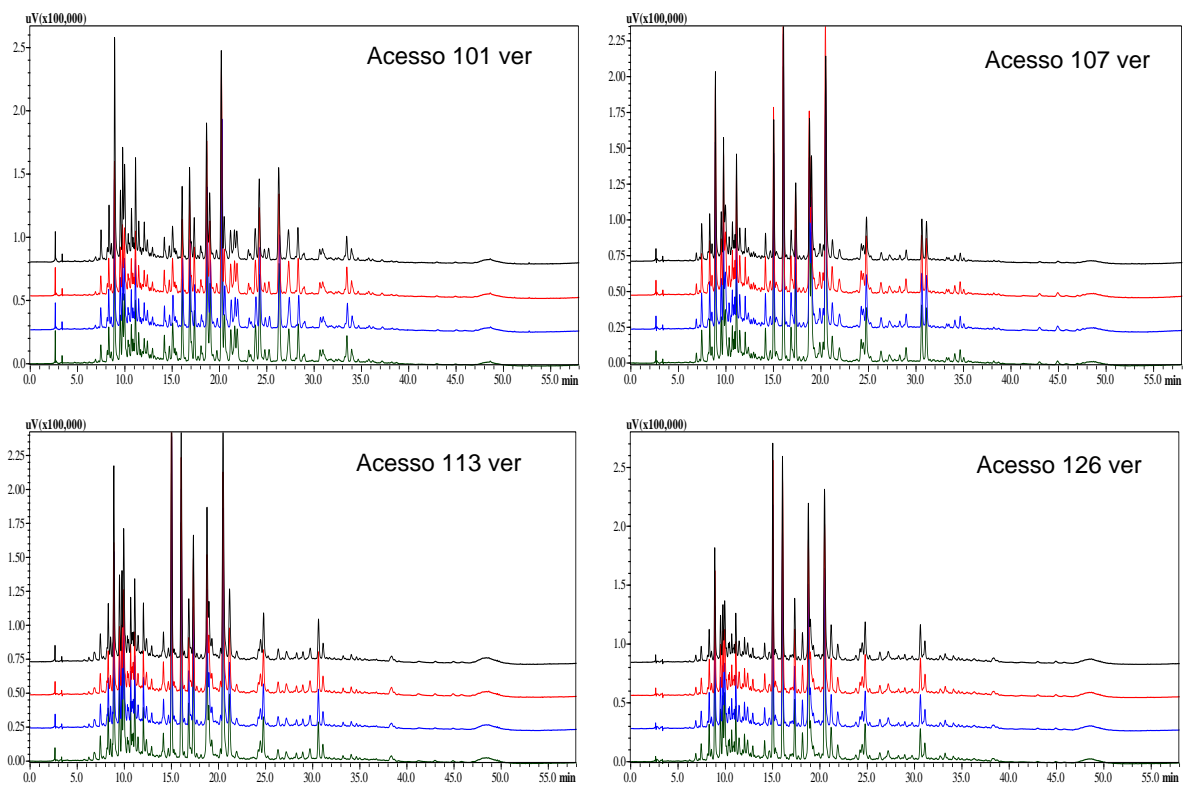
Na Figura 39 estão plotados as quadruplicatas no comprimento de onda 320 nm de cada um dos extratos dos acessos das diferentes extrações provenientes das duas coletas.

**Figura 39** - Cromatogramas *fingerprint* ( $\lambda=320$  nm) dos extratos dos quatro acessos de *C. grewoides* em quadruplicata

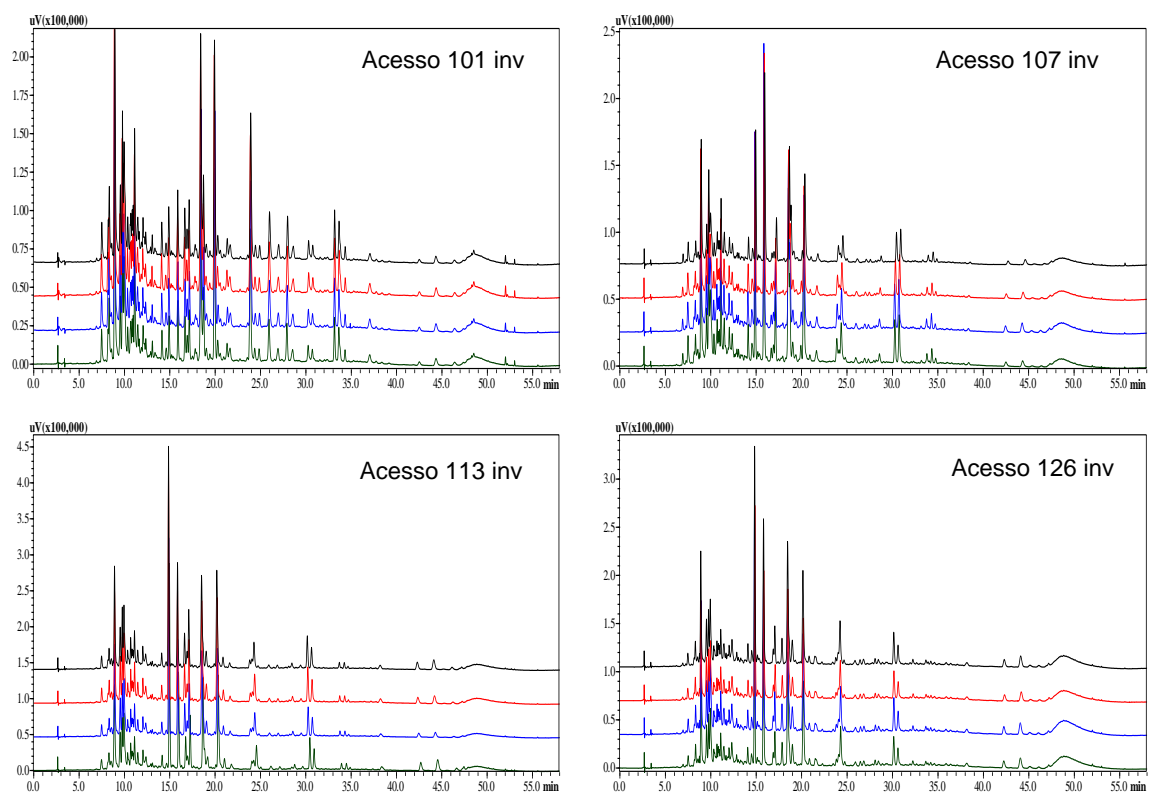
Extrato aquoso (Decocção) Inverno



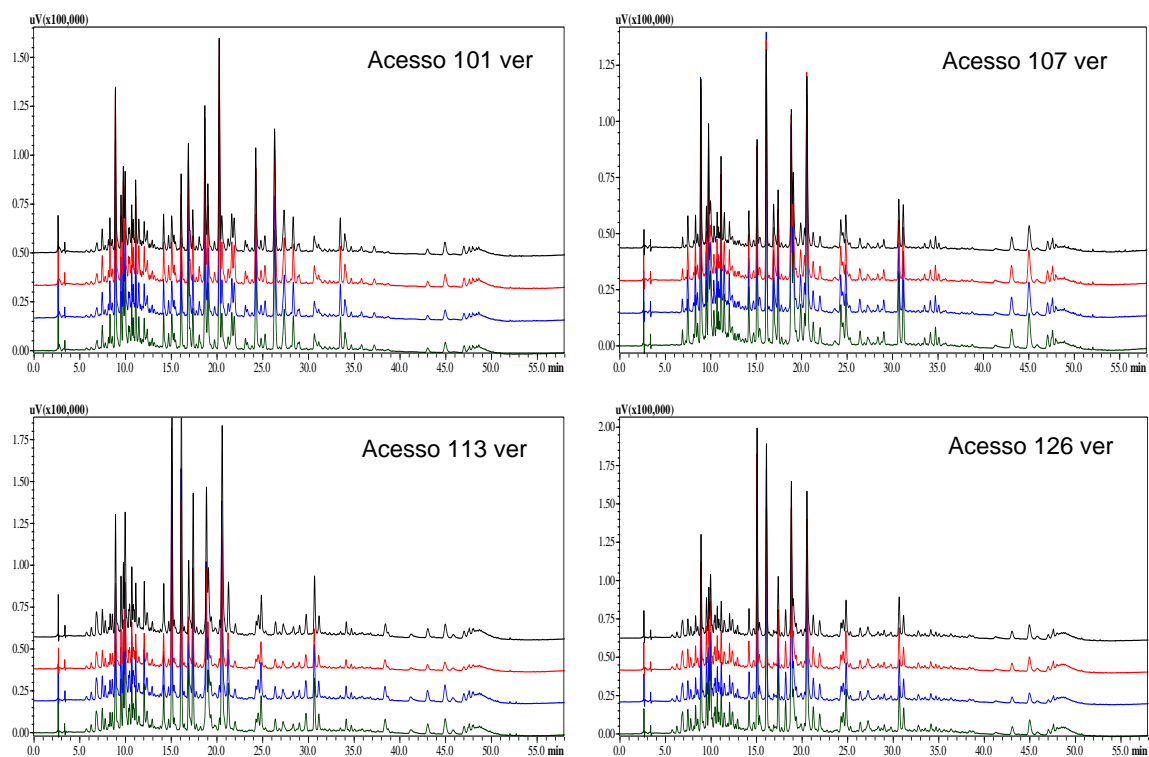
Extrato aquoso (Decocção) Verão



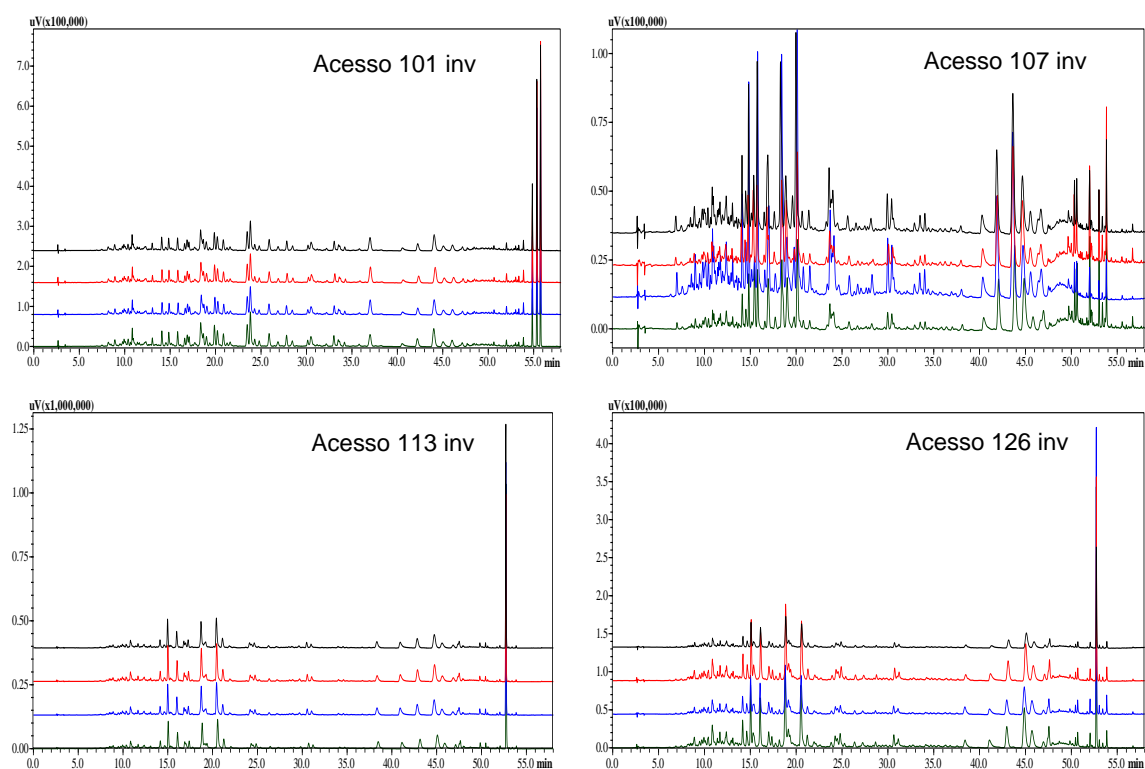
## Extrato hidroalcoólico Inverno



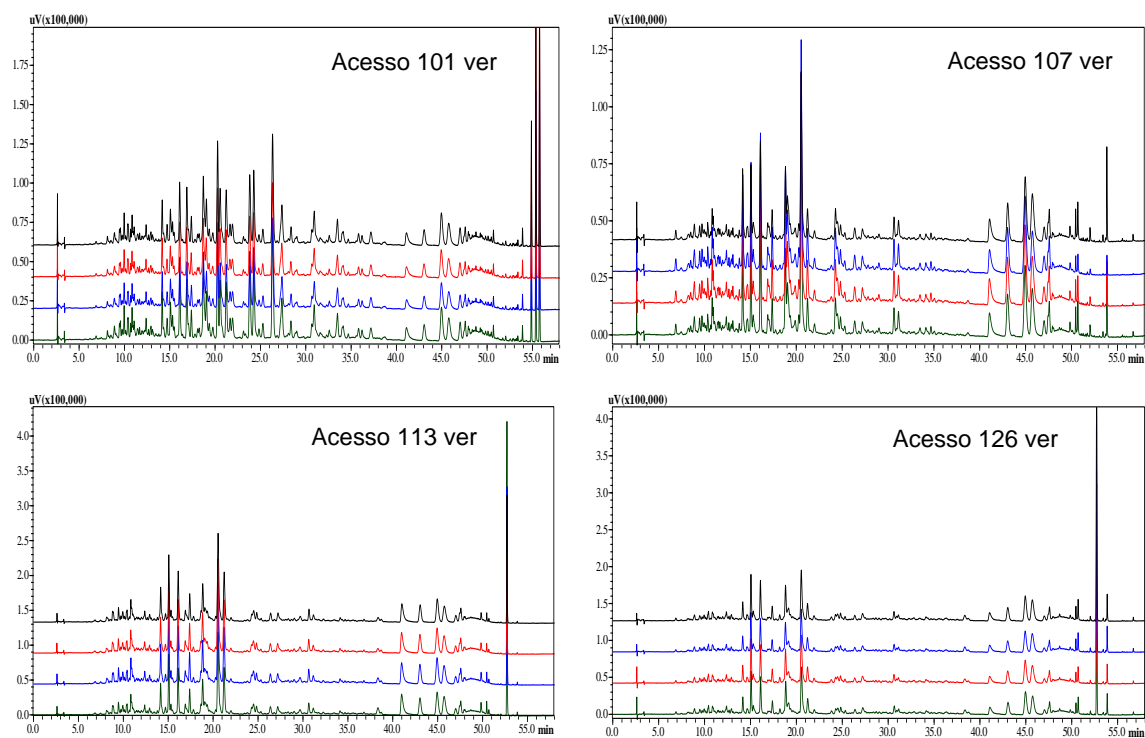
## Extrato hidroalcoólico Verão



### Extrato metanólico Inverno



### Extrato metanólico Verão



Na Figura 39 foi possível observar uma boa reprodutibilidade da metodologia desenvolvida, que é uma das formas de verificar a precisão do

método de separação. No entanto, a realização da análise de componentes principais avaliará melhor as similaridades e diferenças entre as quadruplicatas.

### 5.3 Análise Quimiométrica

#### 5.3.1 Análise de Componentes Principais

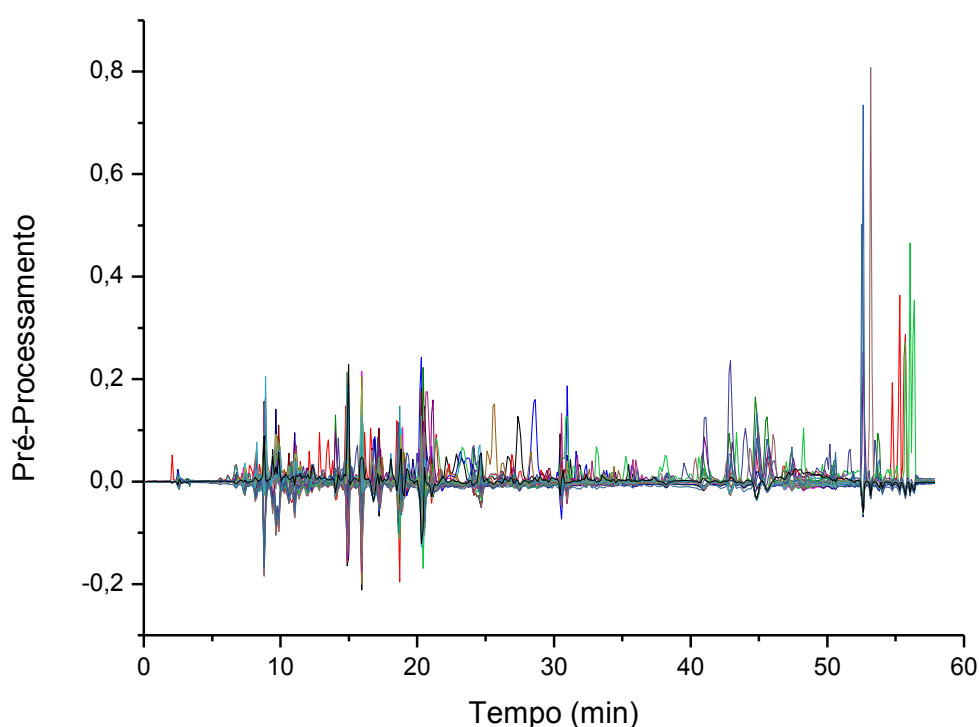
A Análise de Componente Principal (PCA) é um método estatístico de múltiplas variáveis que visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original. A utilização da PCA explica a correlação entre um número de variáveis em termos de um número menor de fatores subjacentes chamados componentes principais (PCs) sem perder muita informação. Este método permite a exploração de dados por projeção de amostras pela análise combinada dos gráficos de escores e *loadings*, que mostram informações sobre as amostras e variáveis, respectivamente, sem o conhecimento prévio da classificação da amostra ou a qual grupo específico pertence [23, 24].

Observando a Figura 39 foi possível verificar algumas semelhanças e diferenças entre os cromatogramas das amostras analisadas, sendo difícil identificá-las ou até mesmo quantificá-las apenas por uma análise visual. Assim, para visualizar e interpretar os dados obtidos de forma mais eficiente foi aplicado a Análise de Componentes Principais, que possibilita a classificação e discriminação entre os *fingerprints* cromatográficos das amostras de *C. grewioides*.

Antes de submeter os dados a PCA foi necessária uma etapa de pré-tratamento e pré-processamento dos dados com o objetivo de adequar as amostras do conjunto de maneira a maximizar ou minimizar o efeito de certas variáveis no todo, ou seja, garantir a eficiência da análise multivariada. Os pré-processamentos das variáveis podem ser feitos basicamente utilizando alguns métodos tais como: Normalizar os espectros, centrar os dados na média, derivar e suavizar utilizando o algoritmo de Savitzky-Golay e aplicar a correção de espalhamento multiplicativo (MSC, *Multiplicative Scatter Correction*) [131].

Neste trabalho, os dados brutos obtidos a partir dos cromatogramas *fingerprint* de *C. grewioides* realizados em quadruplicata passaram por um pré-tratamento (alinhamento dos picos pela técnica do algoritmo “Correlation Optimised Warping”- COW) [123] e pré-processamento (centrado na média), em que os dados adquiridos foram centrados na média, isto é, foi calculada a média dos valores experimentais para cada variável e subtraído cada valor experimental do respectivo valor médio, o qual está representado graficamente na Figura 40 [131].

**Figura 40** - Gráfico de pré-processamento dos dados centrado na média



Após estas etapas, os dados foram organizados em uma matriz contendo 96 linhas (amostras) e 543 variáveis (tempos de retenção, 58 min) e então submetidos à Análise de Componentes Principais.

Neste trabalho, a PCA foi utilizada para estudar as dissimilaridades químicas entre os acessos de *Croton grewioides*, por meio dos seus *fingerprints* cromatográficos, além de verificar o efeito da sazonalidade e do método de extração na composição química desta espécie.

Na análise de componentes principais foi observado que as duas primeiras componentes (Tabela 7) descrevem 38,7% da variância total dos

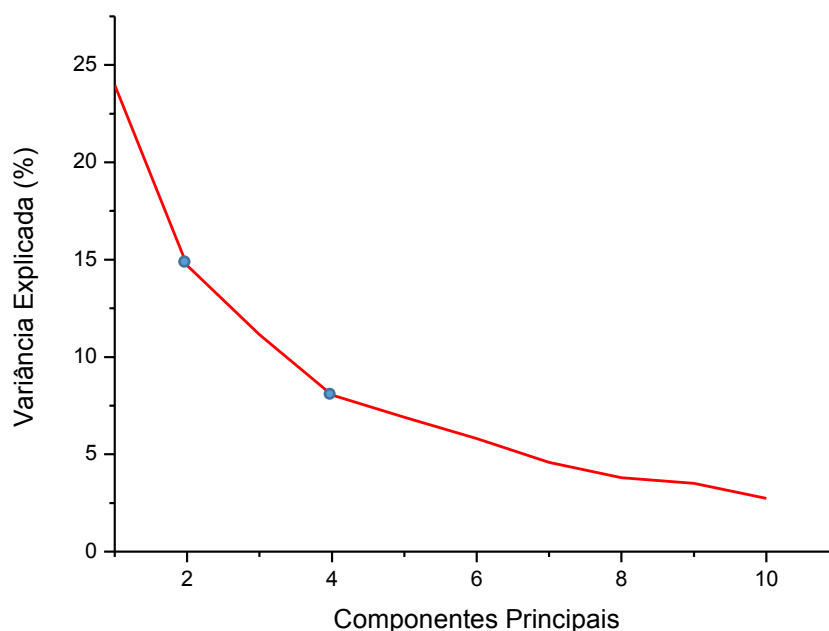
dados (PC1= 24,0% e PC2=14,7%), sendo utilizadas para classificar e discriminar as amostras.

**Tabela 7** - Variância percentual das componentes principais calculadas para os dados da matriz original centrados na média

Componente Principal	Variância Explicada (%)	Variância Acumulada(%)
PC1	24,0	24,0
PC2	14,7	38,7
PC3	11,1	49,8
PC4	8,0	57,8
PC5	6,9	64,7
PC6	5,8	70,5
PC7	4,6	75,1
PC8	3,8	78,9
PC9	3,5	82,4
PC10	2,7	85,1

A Figura 41 mostra graficamente os dados apresentados na Tabela 7 referentes à variância explicada por cada PC.

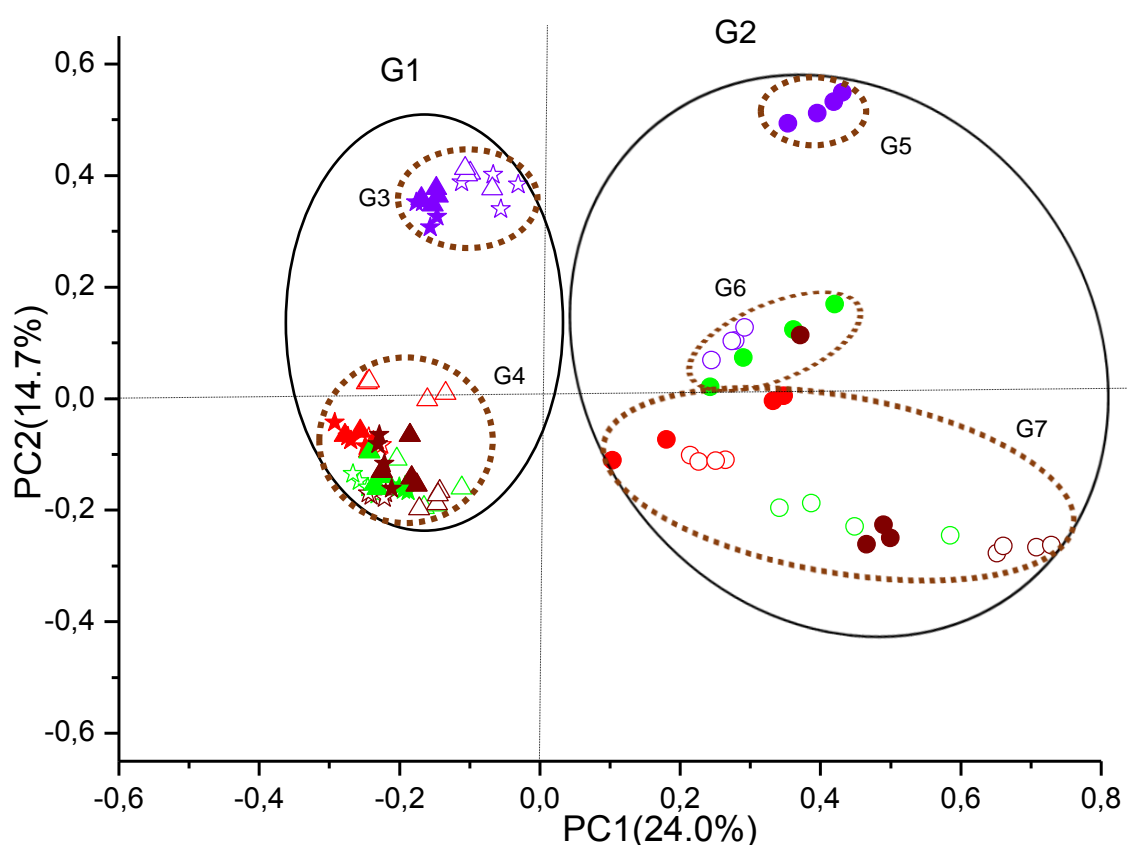
**Figura 41** - Variância explicada (%) para cada componente principal



Através da PCA foi possível reduzir a dimensionalidade da matriz original dos dados de 543 para 2 (2PCs), os quais foram projetados em apenas

duas novas coordenadas, PC1 e PC2, o que facilita a interpretação dos dados de maneira significativa. Essas informações podem ser visualizadas no gráfico de escores PC1 *versus* PC2 apresentado na Figura 42 [11].

**Figura 42** - Gráfico de escores (PC1 *versus* PC2) das amostras de *C. grewioioides*



**Acessos:** 101- Azul, 107- Vermelho, 113- Verde e 126- Marron; **Extratos:** ☆ - Decocção, O- Metanólico e Δ- Hidroalcoólico; **Coleta:** Símbolo aberto- Verão e Símbolo fechado- Inverno.

Com base nas duas primeiras componentes principais (PCs), foi observada a formação de dois grandes grupos distintos, G1 e G2. O grupo G1 caracteriza-se por valores negativos em PC1 sendo formado por todos os extratos hidroalcoólicos e aquosos (decocção) de todos os acessos das duas coletas, enquanto o grupo G2 caracteriza-se por valores positivos em PC1 sendo formado por todos os extratos metanólicos de todos os acessos das duas coletas. Estes dados sugerem que os perfis químicos dos extratos



metanólicos são significativamente diferentes daqueles obtidos pelos métodos de extração hidroalcoólica e decocção, sendo os dois últimos semelhantes entre si.

Dentro desses dois grupos, foi observada a formação de cinco outros grupos (G3 a G7). As amostras 101HV, 101HI, 101DV e 101DI formaram o grupo G3, apresentando PC1 negativo e PC2 positivo. As amostras 107HV, 107HI, 107DV, 107DI, 113HV, 113HI, 113DV, 113DI, 126HV, 126HI, 126DV e 126DI formam o grupo G4, que é caracterizado por valores negativos de PC1 e PC2, exceto para a amostra 107HV que tende a valores próximos de zero na PC2. O grupo G5 é formado apenas pelas amostras de 101MI, enquanto o grupo G6 pelas amostras 101MV e 113MI com valores positivos de PC1 e PC2.

As amostras 107MV, 107MI, 113MV, 126MV e 126MI formam o grupo G7 com valores positivos em PC1 e negativos em PC2. É interessante observar a separação significativa de todas as amostras do acesso 101 em relação às amostras dos demais acessos, exceto pela amostra 101MV que se assemelha a 113MI, formando o grupo G6. Essa tendência pode estar relacionada à origem geográfica do acesso 101, já que é o único proveniente do município de Poço Verde, sugerindo que ele poderia ser uma variedade genética dessa espécie ou que apresenta uma melhor adaptabilidade ambiental.

Considerando os extratos metanólicos dos acessos 101 e 113 foi possível observar a influência da sazonalidade no perfil químico, uma vez que suas respectivas amostras de verão e inverno não pertencem ao mesmo agrupamento. De forma oposta ocorre com os acessos 107 e 126 que, ao se agruparem em G7, demonstraram não sofrer influência da sazonalidade em relação a este método de extração.

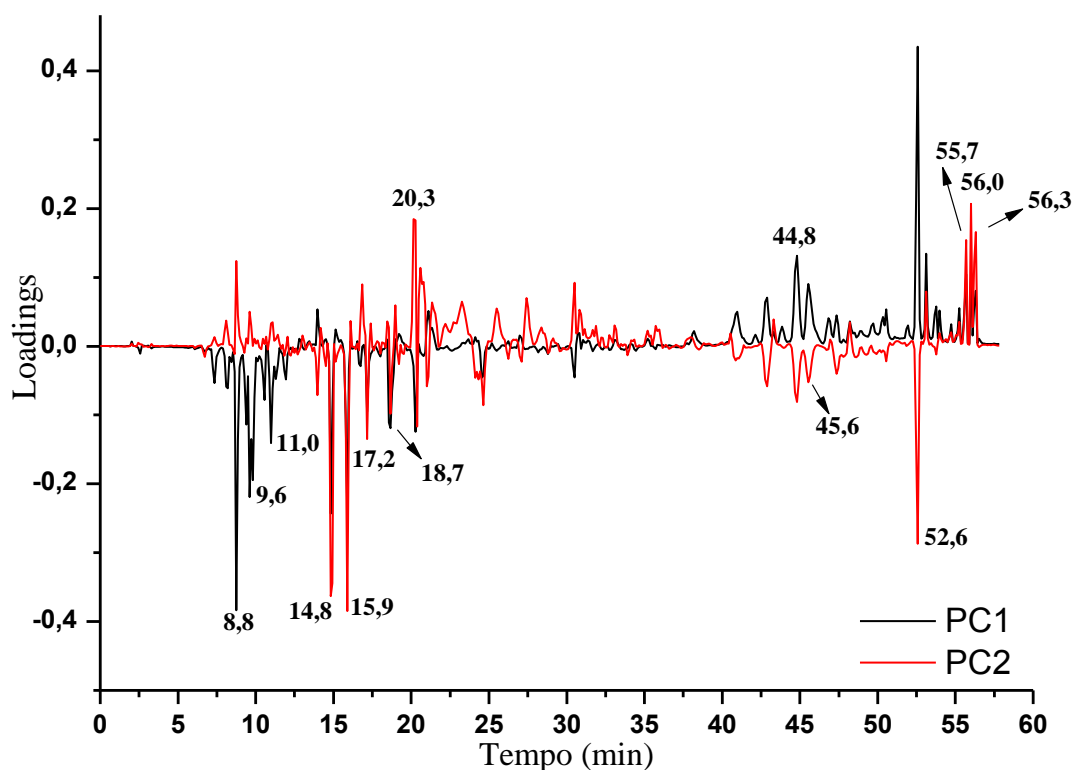
Observando os extratos hidroalcoólico e decocção, os acessos apresentaram suas respectivas amostras de inverno (HI e DI) e verão (HV e DV) agrupadas. As amostras 101HV, 101HI, 101DV e 101DI formam o grupo G3 enquanto as amostras 107HV, 107HI, 107DV, 107DI, 113HV, 113HI, 113DV, 113DI, 126HV, 126HI, 126DV e 126DI agrupam-se em G4. Estes resultados sugeriram que o perfil químico destes acessos, em relação a estas duas formas de extração, não sofreu influência da sazonalidade. Além disso, estes dados reforçaram a menção feita acima de que o acesso 101

apresentou-se diferente em relação aos demais, pois suas amostras formaram um único grupo.

Analisando a distribuição das amostras dos acessos 107 e 126 no gráfico de escores (Figura 42), pode-se supor que eles devam ser geneticamente muito próximos entre si, pois todas as suas preparações de inverno e verão tenderam a se agrupar, as hidroalcoólicas e decocções em G4 e metanólicas em G7. No entanto, uma confirmação dessa suposição poderá ser confirmada após os resultados obtidos a partir dos óleos essenciais e de pesquisas genéticas desses acessos, os quais estão em andamento.

A fim de identificar quais variáveis contribuem para a diferenciação observada entre as amostras no gráfico de escores, que mostram a importância (peso) que cada uma delas tem na construção de cada componente principal, foi analisado o gráfico de *loadings* (Figura 43). Este gráfico apresentou algumas bandas que se destacaram com valores positivos e negativos tanto em PC1 como em PC2 [132-134].

**Figura 43 - Loadings PC1 versus PC2**



Assim, as bandas cromatográficas com tempo de retenção de 44,8; 45,6; 52,6; 55,7; 56,0 e 56,3 minutos, que se caracterizam por valores positivos em PC1, são características das amostras metanólicas, enquanto aquelas com tempo de retenção 8,8; 9,6; 11,0; 14,8; 15,9; 17,2; 18,7 e 20,3 minutos, que se caracterizam por valores negativos em PC1, caracterizam as amostras hidroalcoólicas e decocções. Esses resultados corroboram os observados no gráfico de escores (Figura 42), no qual foi possível a identificação de dois grandes grupos (G1 e G2) sendo que cada um deles foi caracterizado por um grupo específico de metabólitos secundários.

As projeções das amostras 101HV, 101HI, 101DV e 101DI nos valores de PC1 negativo e PC2 positivo (grupo G3) estão relacionadas às bandas com tempo de retenção 8,8; 9,6; 11,0 e 20,3 minutos, que demonstram ser as mais importantes para a diferenciação deste acesso dos demais, que apresentaram como bandas características aquelas com tempos de retenção 14,8; 15,9; 17,2 e 18,7 minutos (PC1 e PC2 negativos, grupo G4).

Apesar de estarem posicionados em diferentes grupos, as amostras 101MV e 101MI (G6 e G5, respectivamente), por apresentarem valores positivos em PC1 e PC2, são caracterizadas pelas mesmas bandas com tempos de retenção de 55,7; 56,0 e 56,3 minutos. Estes resultados reforçam a sugestão de que este é um acesso particular, pois se separa das amostras 107MV, 107MI, 113MV, 126MV e 126MI (G7) que se caracterizam por bandas em 44,8; 45,6 e 52,6 minutos.

Desta forma, a Análise de Componentes Principais possibilitou uma melhor avaliação das semelhanças e diferenças entre os cromatogramas dos quatro acessos de *C. grewoides*, permitindo relacioná-los às suas procedências (Poço Redondo ou Poço verde), estação do ano (inverno e verão) e método de extração (hidroalcoólico, decocção e metanólico).

## 5.4 Isolamento e Identificação dos Constituintes Químicos de *C. grewioides*

### 5.4.1 Isolamento por CLAE-Semipreparativa

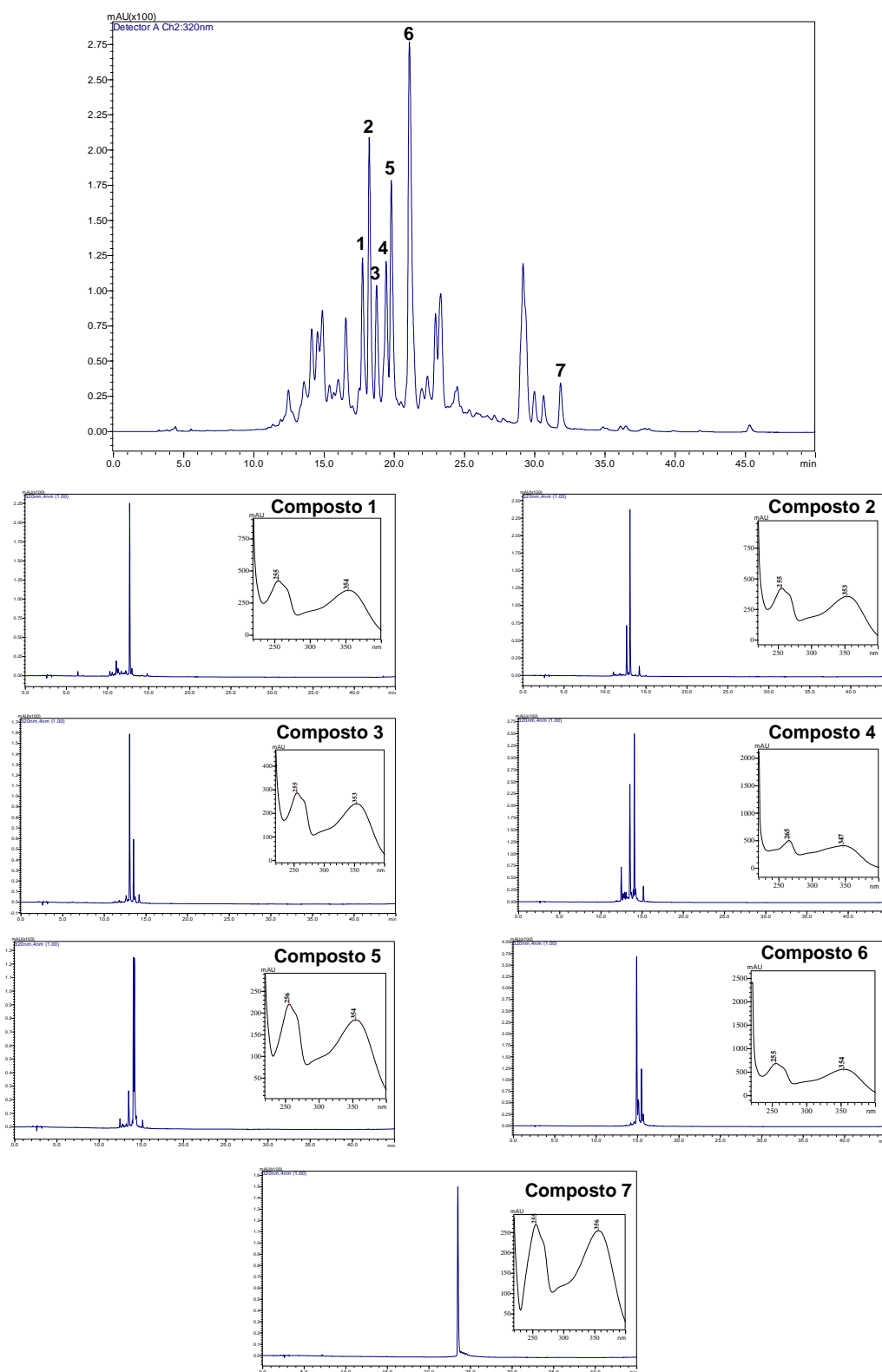
As análises por cromatografia líquida com o Sistema Semipreparativo (seção 4.2), seguindo o procedimento descrito na seção 4.8, permitiram o isolamento de sete compostos, denominados de **1** a **7**, presentes no extrato aquoso (decoção) do acesso 107 da coleta de verão, o qual foi selecionado baseando-se no conhecimento prévio do seu uso na medicina popular [119]. A Tabela 8 mostra a massa obtida de cada composto isolado.

**Tabela 8** - Massas obtidas dos compostos isolados do extrato aquoso acesso 107 (Verão) de *C. grewioides*

Composto	Massa (mg)	Composto	Massa (mg)
<b>1</b>	5,6	<b>5</b>	7,6
<b>2</b>	9,9	<b>6</b>	8,8
<b>3</b>	6,3	<b>7</b>	1,0
<b>4</b>	6,1		

A quantidade de massa obtida foi suficiente para gerar espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais. Para verificar a qualidade do isolamento, cada composto foi injetado no Sistema Analítico (seção 4.2) utilizando o mesmo gradiente usado no sistema semipreparativo. A Figura 44 mostra os cromatogramas do extrato aquoso juntamente com os dos compostos isolados em 320 nm, além de seus respectivos espectros de absorção no UV.

**Figura 44** - Cromatogramas em 320 nm do extrato aquoso acesso 107 (Verão) e de seus respectivos compostos isolados juntamente com seus espectros de absorção no UV



A Figura 44 mostra que os espectros de absorção no UV desses metabólitos apresentam um perfil típico para derivados de flavonoides [135-137].

Embora pôde-se observar pelos cromatogramas que cinco dos compostos isolados não estavam puros, ainda assim foram submetidos à análise por RMN para a identificação de suas estruturas moleculares.

#### 5.4.2 Identificação Estrutural dos Compostos Isolados

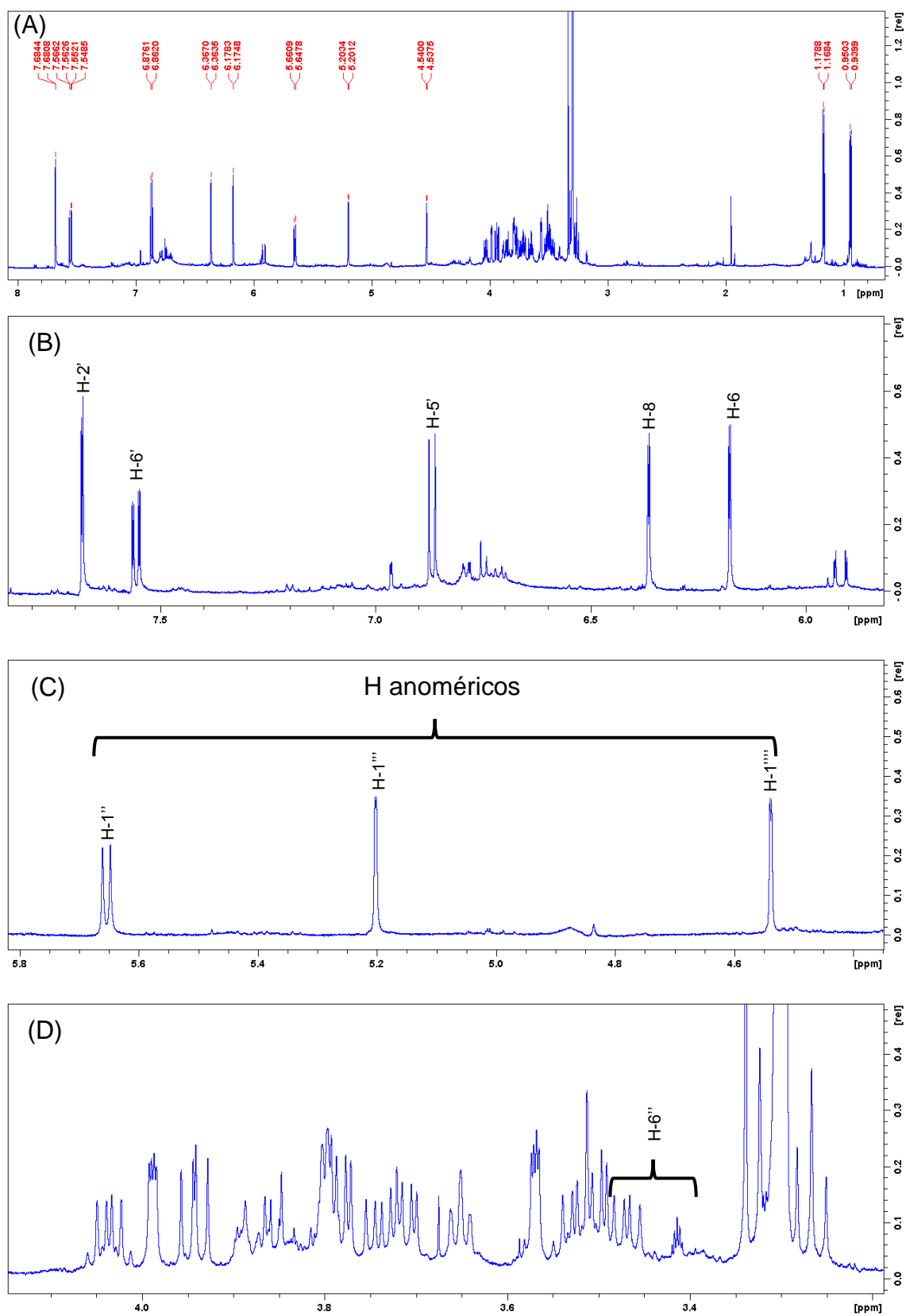
A determinação estrutural dos compostos isolados foi baseada na análise dos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (uni e bidimensionais, COSY, HSQC e HMBC) e por comparação com os dados da literatura.

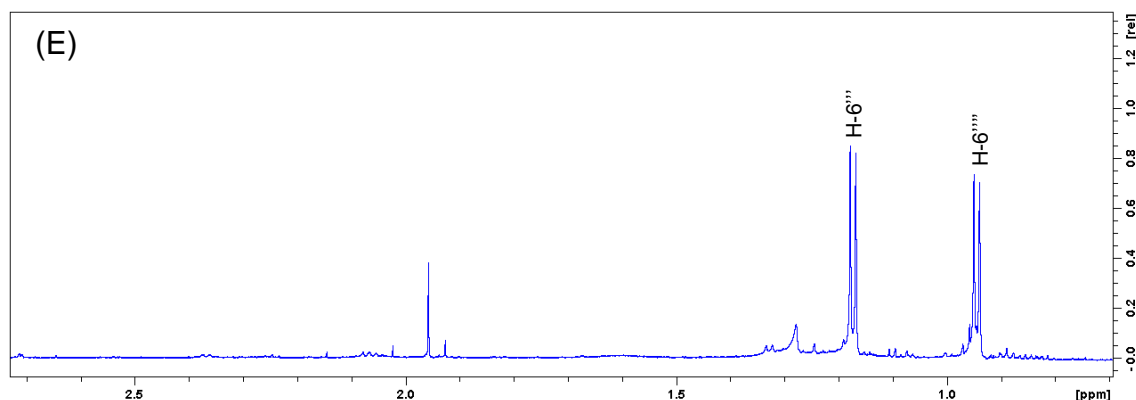
##### Composto 1

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para este composto, obtido em metanol deuterado ( $\text{MeOH-}d_4$ ), apresentaram sinais compatíveis com os da quercetina-3-O-[ $\alpha$ -ramnopiranosil-(1-2)- $\alpha$ -ramnopiranosil-(1-6)- $\beta$ -glicopiranosídeo].

Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 45) foi observada a presença de três sinais de hidrogênios aromáticos (Figura 45-B) em  $\delta_{\text{H}}$  7,68 (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz, H-2'), 7,56 (1H, *dd*,  $J = 8,5$  e  $2,2$  Hz, H-6') e 6,87 (1H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-5'), típicos de hidrogênios do anel B de um flavonoide substituído nos carbonos C-3' e C-4'. Além disso, foram observados dois dubletos, integrando para um hidrogênio cada, um em  $\delta_{\text{H}}$  6,37 e o outro em 6,17 típicos dos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente, do anel A do flavonoide que acoplam em um valor típico de uma relação *meta* entre si apresentando  $J = 2,1$  Hz.

**Figura 45** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 1 (A, total) e suas expansões: (B) entre  $\delta_{\text{H}}$  7,8 e 5,8; (C) entre  $\delta_{\text{H}}$  5,8 e 4,4; (D) entre  $\delta_{\text{H}}$  4,1 e 3,2; (E) entre  $\delta_{\text{H}}$  2,7 e 0,7

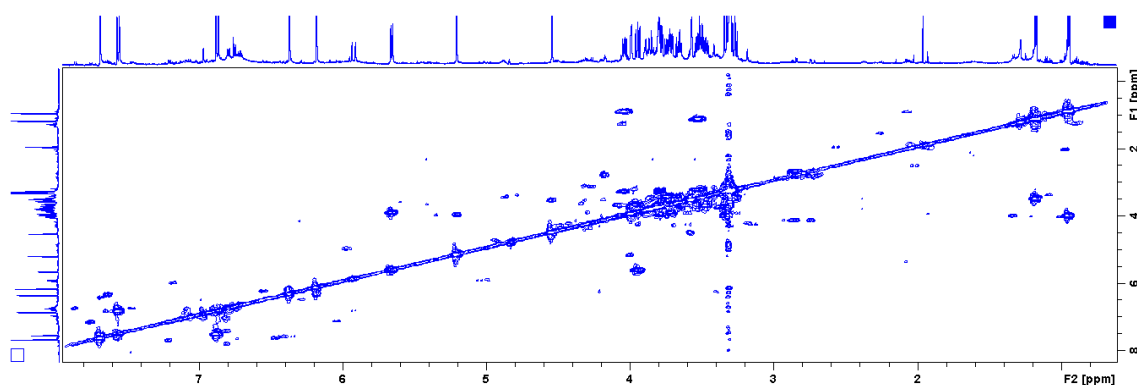




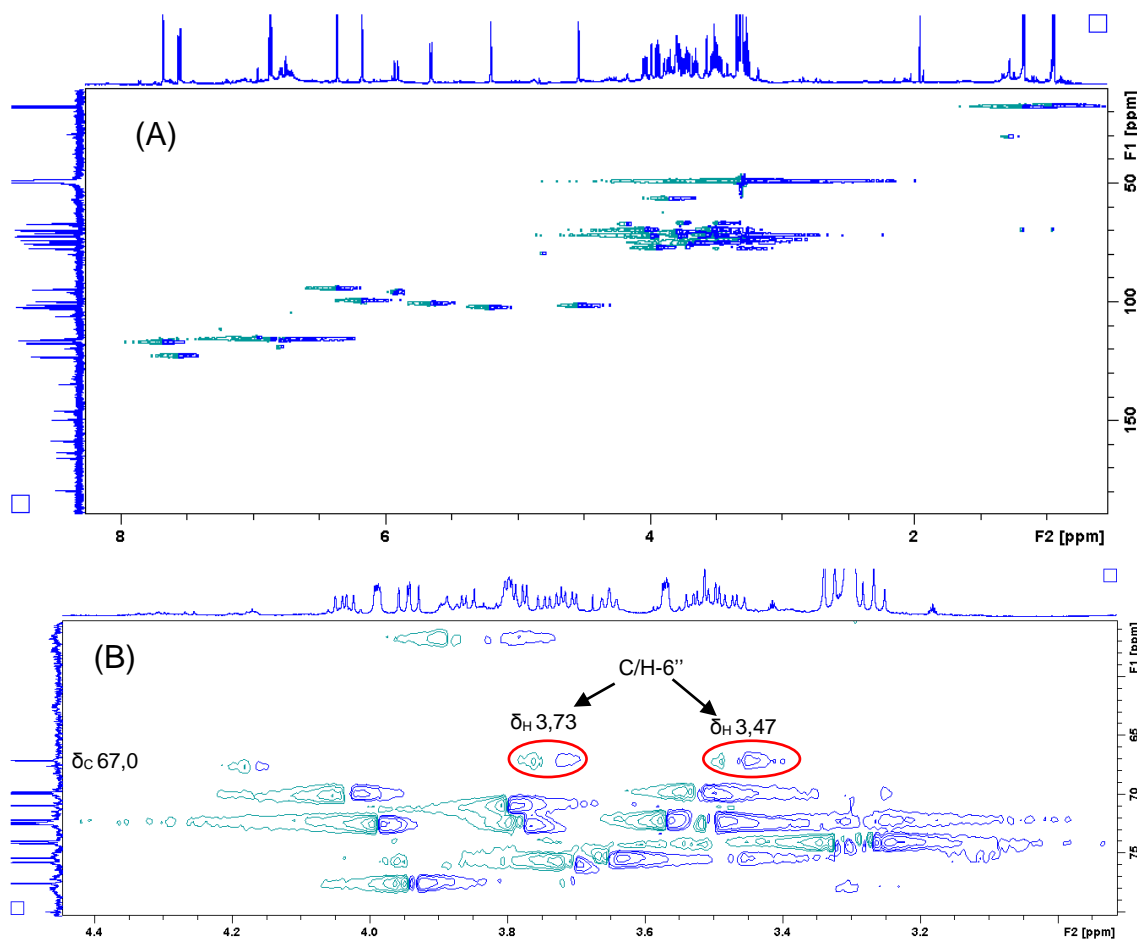
A presença de três dubletos, integrando para um hidrogênio cada, em  $\delta_H$  5,65 ( $J = 7,8$  Hz, H-1''), 5,20 ( $J = 1,3$  Hz, H-1''') e 4,54 ( $J = 1,5$  Hz, H-1'''), indicaram a presença de hidrogênios anoméricos, caracterizando a existência de três unidades de açúcar neste composto. Duas delas correspondem à ramnose, pois a presença de dois dubletos, integrando para três hidrogênios cada, em  $\delta_H$  1,17 ( $J = 6,2$  Hz, H-6'') e 0,95 ( $J = 6,2$  Hz, H-6''') confirmaram a presença das metilas em C-5'' e C-5''', respectivamente. A outra unidade de açúcar foi da glicose, a qual foi confirmada pela presença de dois duplos dubletos em  $\delta_H$  3,47 (1H,  $^2J = 10,2$  e  $^3J = 6,7$  Hz, H-6'') e 3,73 (1H,  $^2J = 10,2$  e  $^3J = 5,8$  Hz, H-6'''), característicos dos hidrogênios metilênicos (CH<sub>2</sub>) em C-6''. Estes hidrogênios são diastereotópicos por serem vizinhos a um centro estereogênico (C-5''), por isso apresentaram acoplamento geminal ( $^2J$ ) e vicinal ( $^3J$ ) com o hidrogênio em C-5'', apresentando-se como um duplo dubleto cada. A confirmação dos acoplamentos ( $^nJ_{H-H}$ ) e a atribuição de todos os deslocamentos químicos dos carbonos e seus respectivos hidrogênios ( $^1J_{C-H}$ ) foram feitas pelos mapas de correlações COSY e HSQC (Figura 46 e 47), respectivamente. Além disso pôde-se confirmar que os sinais dos hidrogênios ligados ao C-6'' se correlacionaram com o mesmo sinal do carbono em  $\delta_C$  67,0 (Figura 47-B), confirmando que uma das unidades de açúcar foi da glicose.



**Figura 46** - Mapa de contorno COSY (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) do Composto 1

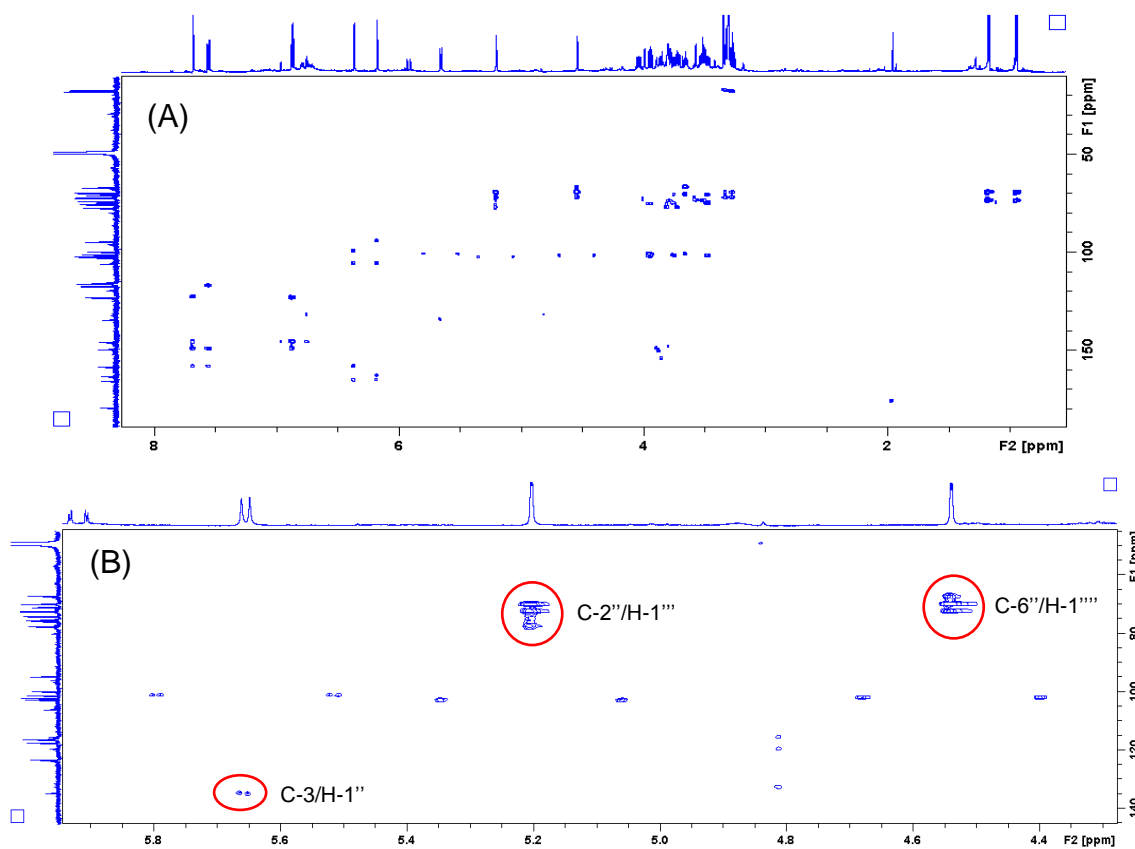


**Figura 47** - Mapa de correlação HSQC do Composto 1 (A, total) e sua expansão: (B) entre  $\delta_H$  4,4 e 3,0 e  $\delta_C$  80 e 55



As posições das unidades de açúcar foram determinadas pelas correlações observadas no HMBC (Figura 48).

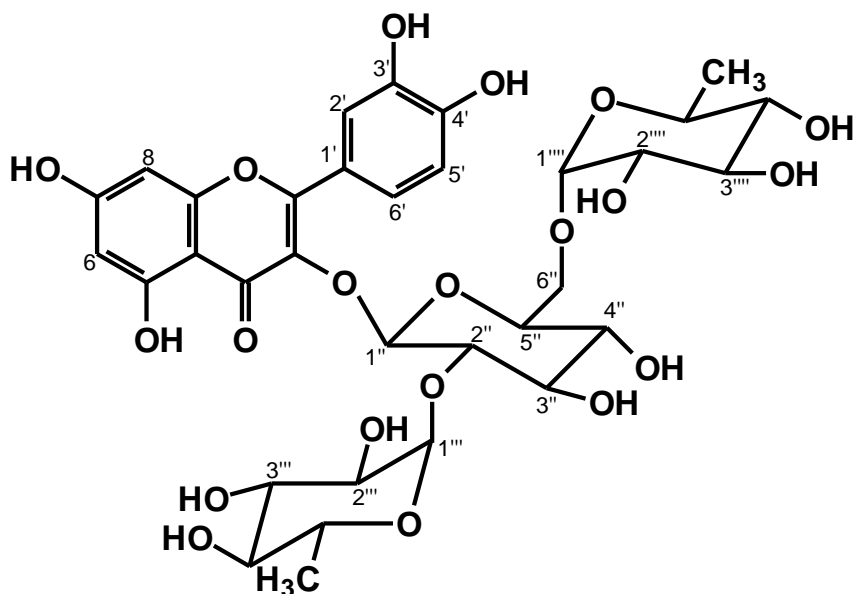
**Figura 48** - Mapa de correlação HMBC do Composto 1(A, total) e sua expansão: (B) entre  $\delta_H$  5,9 e 4,3 e  $\delta_C$  140 e 60



O hidrogênio anomérico atribuído à glicose em  $\delta_H$  5,65 (H-1'') se correlacionou à três ligações com o carbono em  $\delta_C$  134,6, o qual refere-se ao carbono C-3 do anel C do flavonoide. O hidrogênio anomérico de uma das unidades de ramnose em  $\delta_H$  5,20 (H-1''') se correlacionou a três ligações com o carbono C-2'' da glicose em  $\delta_C$  77,5; o terceiro hidrogênio anomérico em  $\delta_H$  4,54 (H-1'''') se correlacionou a três ligações com o carbono em  $\delta_C$  67,0 referente ao carbono C-6'' da glicose (Figura 48-B).

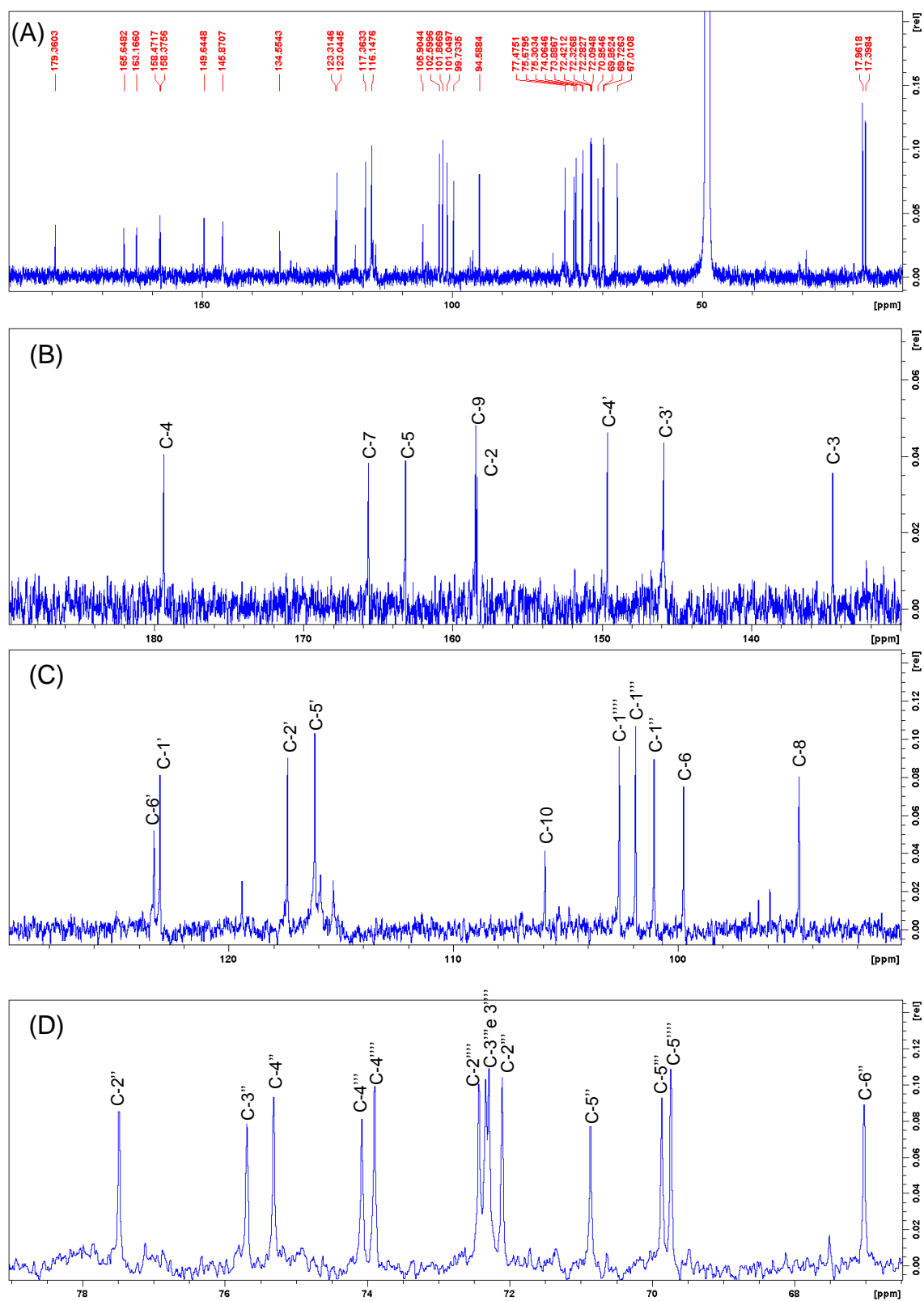
Estas correlações confirmaram a posição relativa das unidades de açúcar, em que a glicose está diretamente ligada à posição oxigenada do carbono C-3 do anel C do flavonol, uma das ramnosas ligada à glicose pelo carbono C-6'' e a outra como um substituinte na posição C-2'' da glicose (Figura 49).

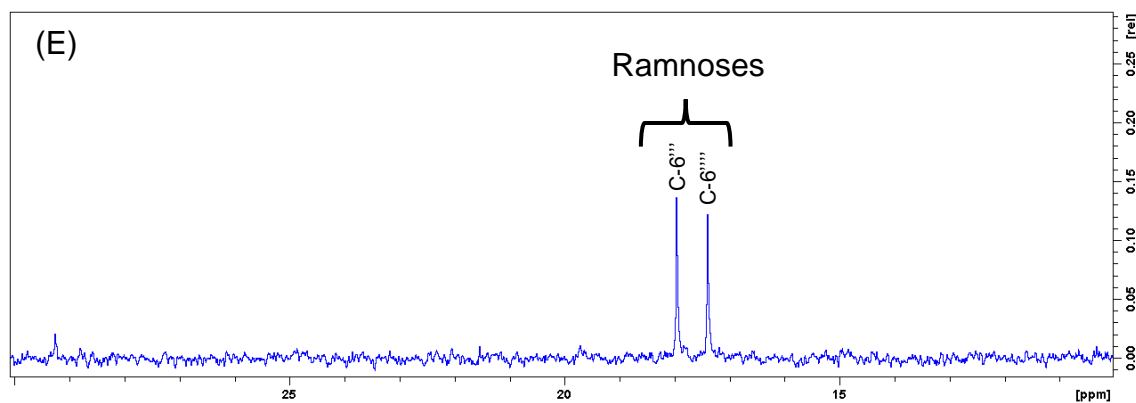
**Figura 49** - Estrutura da Quercetina-3-O-[ $\alpha$ -ramnopiranosil-(1-2)- $\alpha$ -ramnopiranosil-(1-6)- $\beta$ -glicopiranosídeo]



O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 50) corrobora a determinação estrutural feita, pois apresenta sinais característicos do anel flavonoídico. O carbono C-4 referente à carbonila apresentou deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  179,4, típico de um derivado de um flavonol, o qual pôde também ser confirmado pelo sinal em  $\delta_{\text{C}}$  134,6 referente ao carbono C-3 oxigenado. Os demais carbonos oxigenados referentes aos anéis A e B apareceram em  $\delta_{\text{C}}$  163,2; 165,6; 145,9 e 149,6 os quais foram atribuídos aos carbonos C-5, C-7, C-3' e C-4', respectivamente, caracterizando o padrão da quercetina da parte aglicona. Os sinais de carbonos típicos das unidades de açúcar atribuídos puderam ser observados. Assim, os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  101,0 (C-1''); 102,6 (C-1''') e 101,9 (C-1''') foram atribuídos aos carbonos anoméricos da glicose e das duas unidades de ramnose, respectivamente. As unidades de ramnose puderam ser também confirmadas pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  17,9 e 17,4 referentes às metilas dos carbonos C-6''' e C-6''', enquanto a unidade de glicose foi confirmada pelo sinal em  $\delta_{\text{C}}$  67,0 típica do carbono oxigenado em C-6''.

**Figura 50** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 1 (A, total) e suas expansões: (B) entre  $\delta_{\text{C}}$  190 e 130; (C) entre  $\delta_{\text{C}}$  130 e 90; (D) entre  $\delta_{\text{C}}$  79 e 67; (E) entre  $\delta_{\text{C}}$  30 e 10





A Tabela 9 mostra os valores dos deslocamentos químicos referentes a cada hidrogênio e seu respectivo carbono, que puderam ser atribuídos pela análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC) juntamente com dados da literatura que auxiliaram na determinação estrutural deste composto [138-140].

**Tabela 9** - Deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos do composto 1, comparados com dados da literatura

Composto 1				Pereira [138]	
Carbono	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> )	HMBC	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> )
2	158,5	-	H-2'e 6'	157,1	-
3	134,6	-	-	133,0	-
4	179,4	-	-	177,7	-
5	163,2	-	H-6	161,5	-
6	99,7	6,17 ( <i>d</i> ; 2,1)	H-8	99,1	6,18 ( <i>d</i> ; 1,7)
7	165,6	-	H-6 e 8	164,3	-
8	94,6	6,37 ( <i>d</i> ; 2,1)	H-6	94,0	6,38 ( <i>d</i> ; 1,7)
9	158,4	-	H-8	157,7	-
10	105,9	-	H-6, 8	104,3	-
1'	123,0	-	H-2', 5'	121,0	-
2'	117,4	7,68 ( <i>d</i> ; 2,2)	H-6'	116,4	7,47 ( <i>d</i> ; 2,0)
3'	145,9	-	H-2', 5'	145,2	-
4'	149,6	-	H-5', 2', 6'	148,7	-
5'	116,1	6,87 ( <i>d</i> ; 8,5)	H-6'	115,5	6,85 ( <i>d</i> ; 8,4)
6'	123,3	7,56 ( <i>dd</i> ; 8,5 e 2,2)	H-2', 5'	122,5	7,51 ( <i>dd</i> ; 2,0 e 8,4)
1''	101,0	5,65 ( <i>d</i> ; 7,8)	H-2'', 3'', 5''	98,9	5,50 ( <i>d</i> ; 7,6)
2''	77,5	3,94 ( <i>dd</i> ; 9,6 e 7,8)	H-3'', 1'''	77,8	3,45
3''	75,7	3,71 ( <i>dd</i> ; 9,6 e 3,5)	H-2''	76,1	3,25
4''	75,3	3,65 ( <i>tt</i> ; 6,4)	H-5'', 6''	77,0	3,39
5''	70,8	3,74 ( <i>m</i> )	H-4'', 6''	70,1	3,01
6''	67,0	3,47 ( <i>dd</i> ; 10,2 e 6,7) 3,73 ( <i>dd</i> ; 10,2 e 5,8)	H-1''', 4''	67,4	3,26/ 3,66
1'''	102,6	5,20 ( <i>d</i> ; 1,3)	H-2'', 2'''	101,1	4,33 <i>s</i> /
2'''	72,1	3,57 ( <i>dd</i> ; 3,5, 1,6)	H-4'''	70,7	3,35
3'''	72,3	3,79 ( <i>dd</i> ; 9,6 e 3,5)	H-1'''	72,1	3,04
4'''	74,1	3,27 ( <i>t</i> ; 9,5)	H-5'''	70,9	3,24
5'''	69,8	4,04 ( <i>dd</i> ; 9,7 e 6,2)	H- 4''', 1'''	68,6	3,21
6'''	17,9	1,17 ( <i>d</i> ; 6,2)	H-5''', 4'''	17,8	0,93 ( <i>d</i> ; 6,9)
1''''	101,9	4,54 ( <i>d</i> ; 1,5)	H-6'', 5''''	101,0	5,03 <i>s</i> /
2''''	72,4	3,99 ( <i>dd</i> ; 3,3 e 1,6)	-	70,9	3,73
3''''	72,3	3,49 ( <i>dd</i> ; 9,5 e 3,5)	H-1''''	70,9	3,47
4''''	73,9	3,32 ( <i>t</i> ; 9,5)	H-3''''', 5''''', 2''''', 6'''''	72,2	3,13
5''''	69,7	3,53 ( <i>dd</i> ; 9,5 e 6,3)	H-4''''', 1'''''	68,5	3,74
6''''	17,4	0,95 ( <i>d</i> ; 6,2)	H-5''''', 4'''''	17,9	0,78 ( <i>d</i> ; 6,1)

$\delta$ : Deslocamento químico (ppm); *m*: multiplicidade; *J* (Hz): Constante de Acoplamento

Estes dados corroboram as atribuições anteriormente realizadas nesta seção e estão de acordo com os dados da literatura para a quercetina triglicosilada, a quercetina-3-O-[ $\alpha$ -ramnopiranosil-(1-2)- $\alpha$ -ramnopiranosil-(1-6)- $\beta$ -glicopiranosídeo] [138].

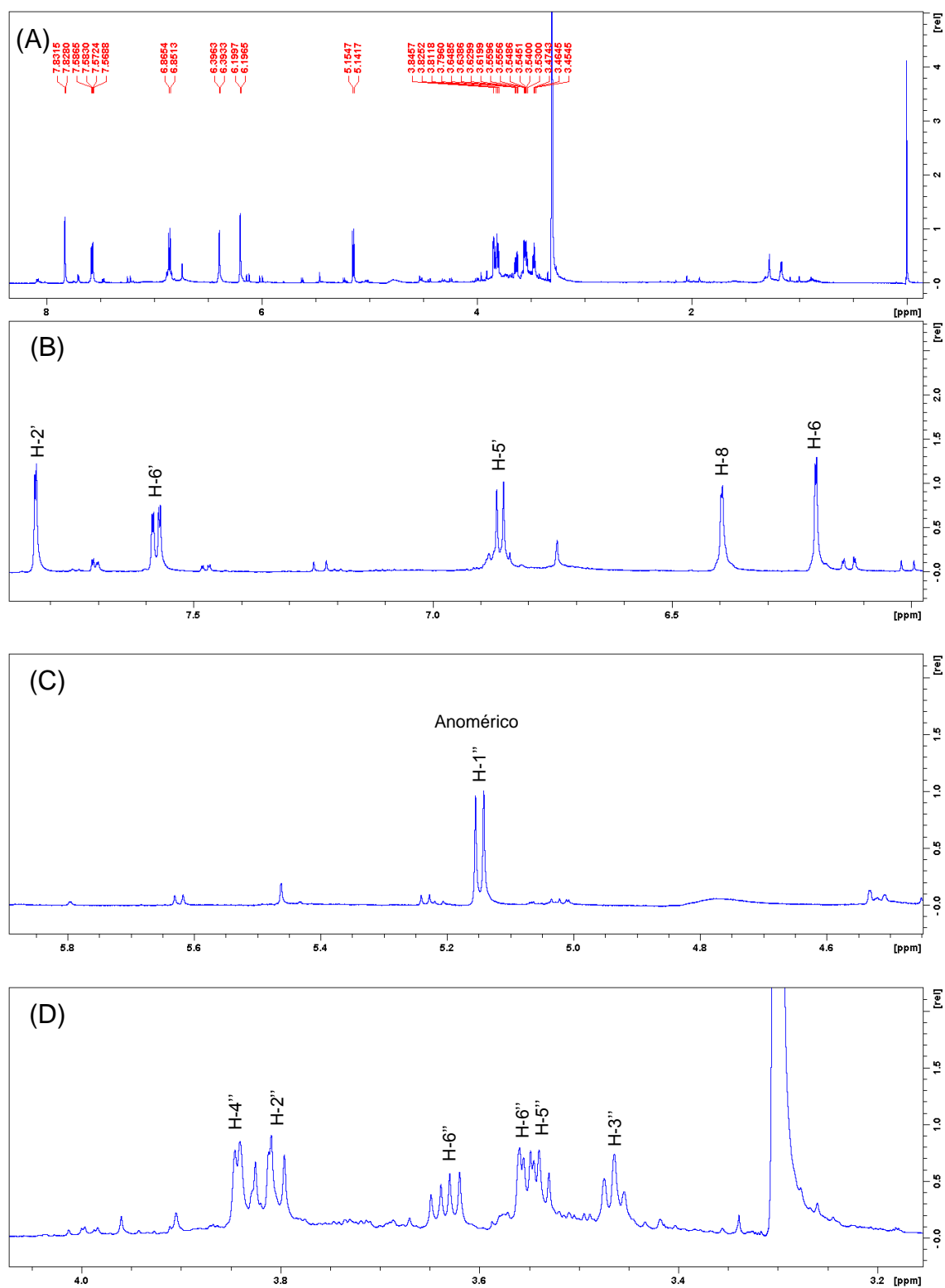
Este composto está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Croton*, mas já foi relatado na literatura em espécies da família Fabaceae (*Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa*), Anacardiaceae (*Spondias venulosa*), Caricaceae (*Vasconcellea quercifolia* A. St.-Hil. e *Vasconcellea pubescens* A. DC.) e Grossulariaceae (*Ribes rubrum*) [138-143].

## Composto 6

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para este composto, obtido em metanol deuterado ( $\text{MeOH-}d_4$ ), apresentaram sinais compatíveis com os da quercetina-3-O- glicosídeo.

Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 51) foi observada a presença de cinco sinais de hidrogênios aromáticos (Figura 51-B). Destes cinco, três apresentaram multiplicidades e deslocamentos químicos em uma região típica dos hidrogênios do anel B de um flavonoide substituído nos carbonos C-3' e C-4'. Assim, os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,83 (1H, *d*,  $J = 2,1$  Hz), 7,58 (1H, *dd*,  $J = 8,4$  e  $2,1$  Hz) e 6,86 (1H, *d*,  $J = 8,4$  Hz) foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5'. Os outros dois hidrogênios aromáticos apareceram como um dubleto cada, com  $J = 1,9$  Hz, e deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{H}}$  6,39 e 6,20 típicos dos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente, do anel A do flavonoide.

**Figura 51** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 6 (A, total) e suas expansões: (B) entre  $\delta_{\text{H}}$  7,8 e 5,8; (C) entre  $\delta_{\text{H}}$  5,8 e 4,4; e (D) entre  $\delta_{\text{H}}$  4,1 e 3,2

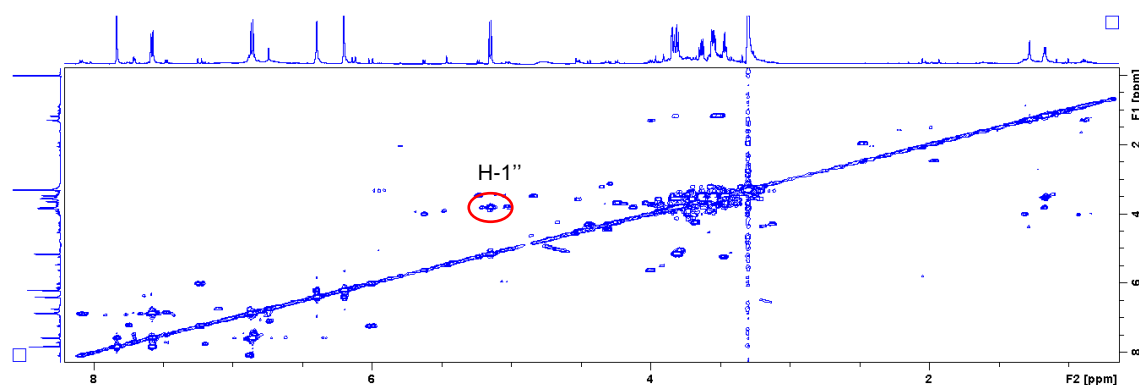




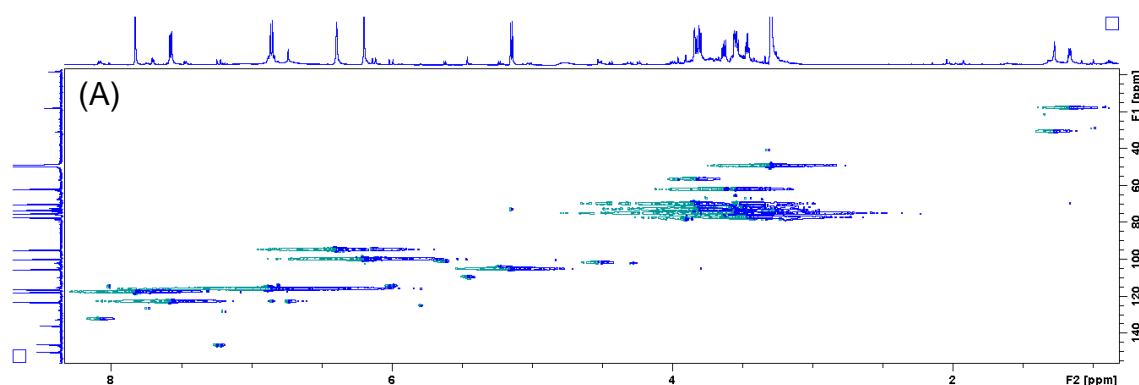
A presença de um dubleto, integrando para um hidrogênio, em  $\delta_H$  5,15 e constante de acoplamento  $J = 7,8$  Hz, caracterizou o hidrogênio anomérico (H-1'') de uma unidade glicosídica. Este açúcar foi também confirmado pelos dois duplos dubletos em  $\delta_H$  3,64 (1H,  $^2J = 11,5$  e  $^3J = 6,1$  Hz, H-6'') e 3,54 (1H,  $^2J = 11,5$  e  $^3J = 6,3$  Hz, H-6'') característico dos hidrogênios metilênicos em H-6'' que apresentaram acoplamento geminal e vicinal com o H-5''. Além disso, os deslocamentos químicos dos carbonos e suas correlações vistas no HSQC também confirmaram a unidade glicosídica, em que os sinais dos hidrogênios atribuídos à C-6'' se correlacionaram com o mesmo sinal do carbono em  $\delta_C$  61,9.

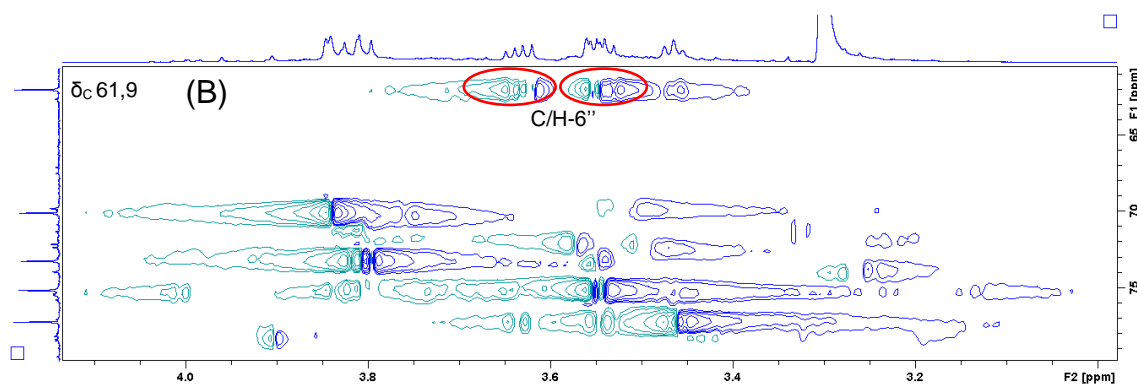
A confirmação dos acoplamentos ( $^nJ_{H-H}$ ) e a atribuição de todos os deslocamentos químicos dos carbonos e seus respectivos hidrogênios ( $^1J_{C-H}$ ) foram feitas pelos mapas de correlações COSY e HSQC (Figura 52 e 53).

**Figura 52** - Mapa de contorno COSY (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) do Composto 6



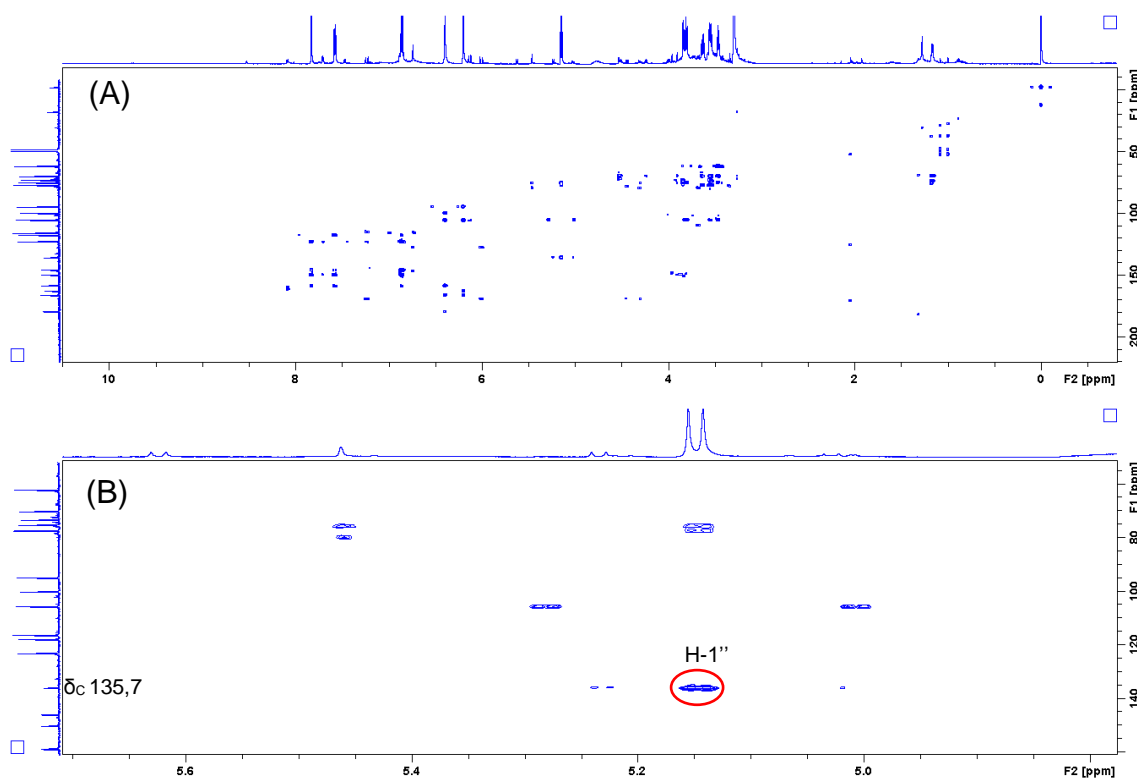
**Figura 53** - Mapa de correlação HSQC do Composto 6 (A, total) e (B) entre  $\delta_H$  4,1 e 3,0 e entre  $\delta_C$  80 e 60



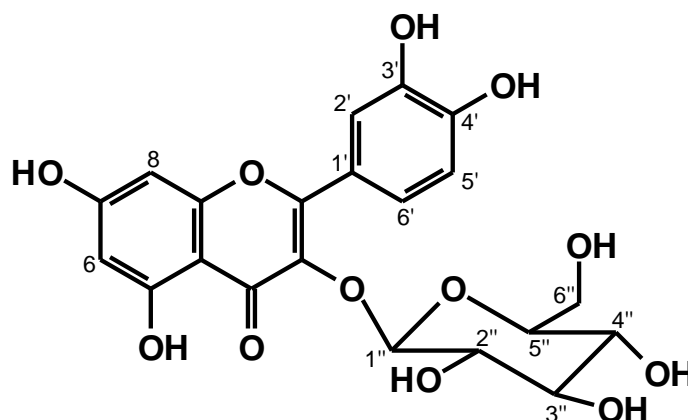


A posição da unidade de açúcar foi determinada pelas correlações observadas no HMBC (Figura 54).

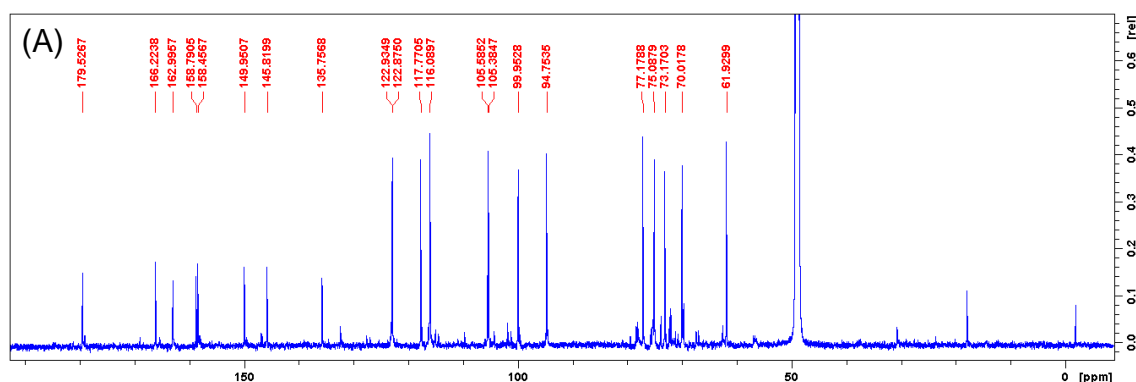
**Figura 54** - Mapa de correlação HMBC do Composto 6 (A, total) e sua expansão: (B) entre  $\delta_H$  5,7 e 4,8 e entre  $\delta_C$  150 e 60

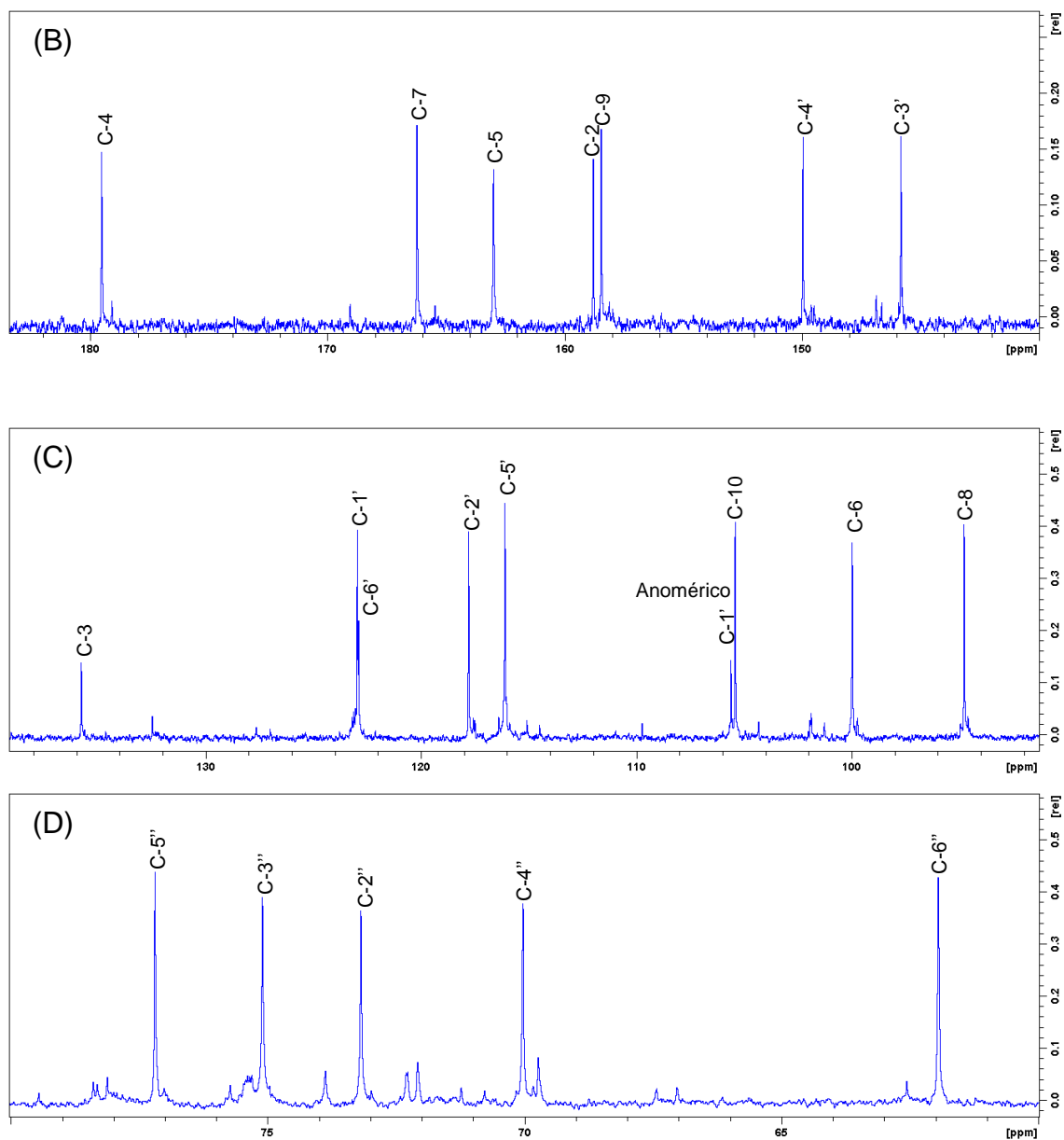


Assim, na Figura 54-B, foi possível ver a correlação do H-1'', em  $\delta_H$  5,15 (anomérico) a três ligações com o carbono em  $\delta_C$  135,7, deslocamento químico típico do carbono C-3 do anel C de um derivado de flavonol, confirmando que a unidade glicosídica está diretamente ligada à posição oxigenada deste carbono (Figura 55).

**Figura 55** - Estrutura da Quercetina-3-O-glicosídeo

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 56) corrobora a determinação estrutural feita, pois apresentou os sinais característicos do anel flavonoídico e da unidade de glicose. O carbono C-4 referente à carbonila apresentou deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  179,5 típico de um derivado de um flavonol, o qual pôde também ser confirmado pelo sinal em  $\delta_{\text{C}}$  135,7 referente ao carbono C-3 oxigenado. Os demais carbonos oxigenados referentes aos anéis A e B apareceram em  $\delta_{\text{C}}$  163,0; 166,2; 145,8 e 149,9 os quais foram atribuídos aos carbonos C-5, C-7, C-3' e C-4', respectivamente, caracterizando o padrão da quercetina da parte aglicona. Além dos outros sinais típicos de carbonos da unidade de glicose, os quais foram comparados com dados da literatura [144, 145], destacaram-se os sinais do carbono em  $\delta_{\text{C}}$  105,6 e 61,9 que foram atribuídos ao carbono anomérico (C-1'') e ao carbono metilênico (C-6''), respectivamente.

**Figura 56** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 6 (A, total) e suas expansões: (B) entre  $\delta_{\text{C}}$  183 e 140; (C) entre  $\delta_{\text{C}}$  140 e 90; (D) entre  $\delta_{\text{C}}$  80 e 60



A Tabela 10 mostra os valores dos deslocamentos químicos de todos os hidrogênios e carbonos, os quais puderam ser atribuídos pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC e por comparação com dados da literatura [145, 146].

**Tabela 10** - Deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos do composto 6 comparados com dados da literatura

Composto 6				Islam [145]	
Carbono	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> )	HMBC	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> )
2	158,8	-	H-2', 6'	158,4	-
3	135,7	-	-	135,6	-
4	179,5	-	-	179,4	-
5	163,0	-	H-6	162,9	-
6	100,0	6,20 ( <i>d</i> ; 1,9)	H-8	99,8	6,19 ( <i>d</i> ; 2,0)
7	166,2	-	H-6, 8	165,9	-
8	94,8	6,39 ( <i>d</i> ; 1,9)	H-6	94,7	6,38 ( <i>d</i> ; 2,0)
9	158,4	-	H-8	158,4	-
10	105,4	-	H-6, 8	105,6	-
1'	122,9	-	H-2', 5'	123,0	-
2'	117,8	7,83 ( <i>d</i> ; 2,1)	H-6'	117,5	7,71 ( <i>d</i> ; 2,0)
3'	145,8	-	H-2', 5'	145,8	-
4'	149,9	-	H-5', 2', 6'	149,8	-
5'	116,1	6,86 ( <i>d</i> ; 8,4)	H-6'	116,0	6,87 ( <i>d</i> ; 8,4)
6'	122,8	7,58 ( <i>dd</i> ; 8,4 e 2,1)	H-2', 5'	123,2	7,58 ( <i>dd</i> ; 2,0 e 8,4)
1''	105,6	5,15 ( <i>d</i> ; 7,8)	H-2'', 3'', 5''	104,3	5,23 ( <i>d</i> ; 7,6)
2''	73,2	3,80 ( <i>m</i> )	H-1'', 3'', 4''	75,7	3,48 ( <i>t</i> ; 9,2)
3''	77,2	3,45 ( <i>t</i> ; 5,9)	H-1'', 5'', 6''	78,1	3,35 ( <i>t</i> ; 8,8)
4''	70,0	3,83 ( <i>m</i> )	H-3'', 5'', 6''	71,2	3,43 ( <i>t</i> ; 9,6)
5''	75,1	3,54 ( <i>m</i> )	H-1'', 2'', 3'', 4''	78,3	3,24 ( <i>m</i> )
6''	61,9	3,64 ( <i>dd</i> ; 11,5 e 6,1); 3,54 ( <i>dd</i> , 11,5 e 6,3)	H-5'', 4''	62,5	3,73 ( <i>dd</i> ; 2,0 e 11,6); 3,56 ( <i>dd</i> ; 5,2 e 11,6)

$\delta$ : Deslocamento químico (ppm); *m*: multiplicidade; *J* (Hz): Constante de Acoplamento

Assim, os dados confirmaram a determinação estrutural realizada para o composto 6, o qual refere-se a quercetina glicosilada nomeada de quercetina-3-O- glicosídeo.

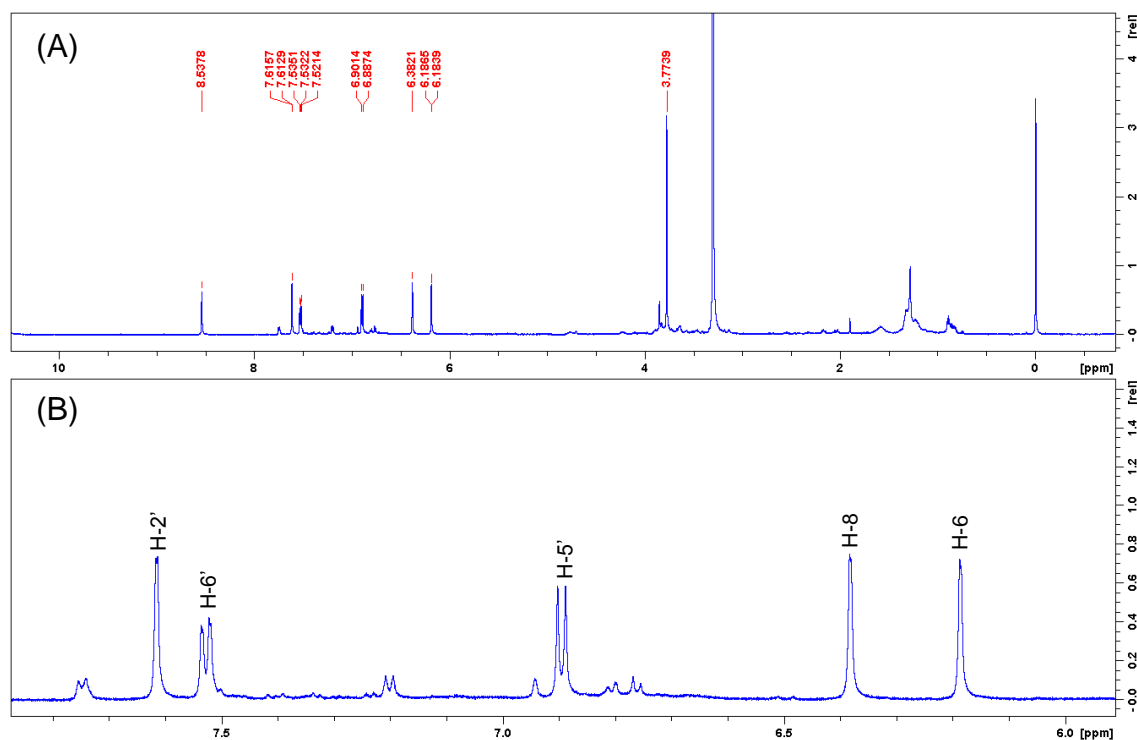
Este composto já foi isolado na espécie *Croton pedicellatus* em 2012 por Lopes e colaboradores [64], sendo, no entanto, a primeira vez descrito em *C. grewioides*.

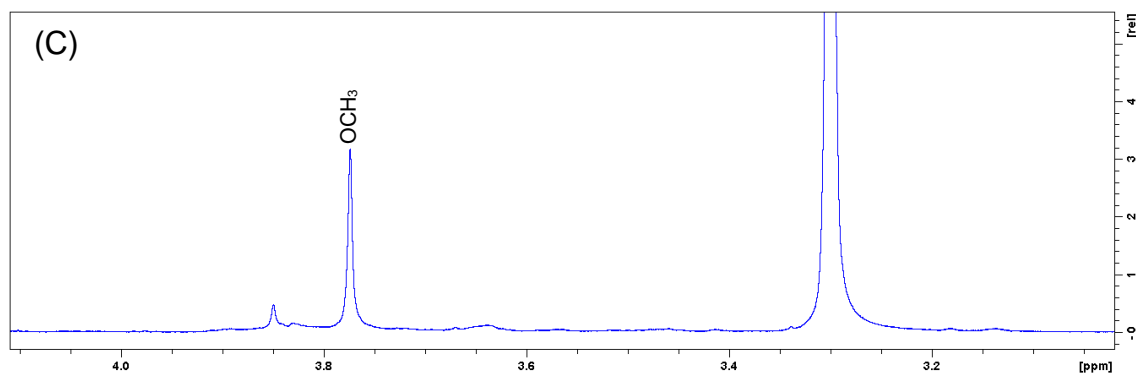
## Composto 7

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para este composto, obtido em metanol deuterado ( $\text{MeOH-}d_4$ ), apresentou sinais compatíveis com os da quercetina-3-O-metil.

Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 57) foi observada a presença de três sinais de hidrogênios aromáticos (Figura 57-B), integrando para um hidrogênio cada, em  $\delta_{\text{H}}$  7,61 (*d*,  $J = 1,8$  Hz, H-2'); 7,53 (*dd*,  $J = 8,4$  e  $1,8$  Hz, H-6') e 6,89 (*d*,  $J = 8,4$  Hz, H-5'), típicos de hidrogênios do anel B de um flavonoide substituído nos carbonos C-3' e C-4'. Além disso, foram observados dois dubletos, integrando para um hidrogênio cada, um em  $\delta_{\text{H}}$  6,38 ( $J = 1,5$  Hz,) e o outro em 6,18 ( $J = 1,5$  Hz) típicos dos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente, do anel A do flavonoide.

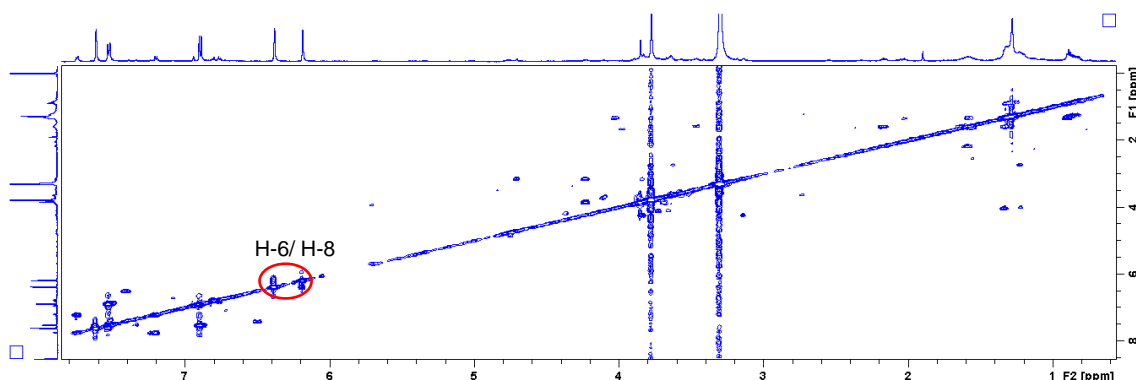
**Figura 57** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 7 (A, total) e suas expansões: (B) entre  $\delta_{\text{H}}$  7,8 e 5,9; e (C) entre  $\delta_{\text{H}}$  4,1 e 3,0



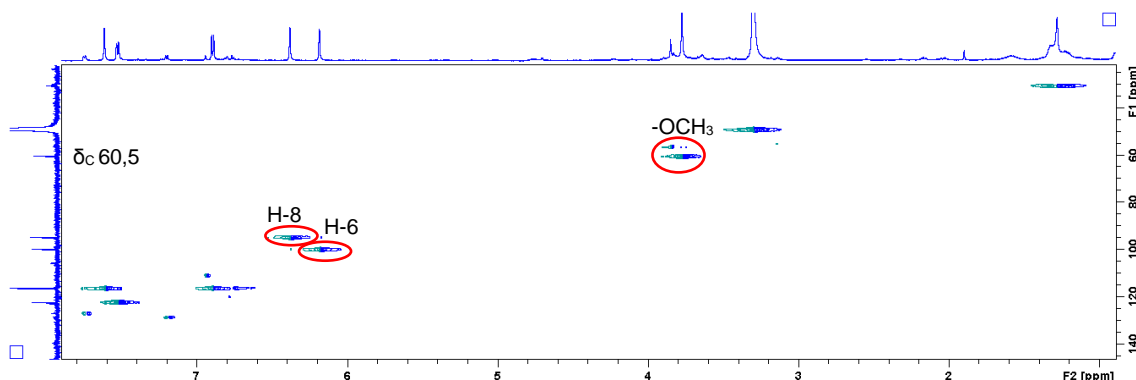


A confirmação dos acoplamentos ( $^nJ_{H-H}$ ) e a atribuição de todos os deslocamentos químicos dos carbonos e seus respectivos hidrogênios ( $^1J_{C-H}$ ) foram feitas pelos mapas de correlações COSY e HSQC (Figura 58 e 59) [147-149].

**Figura 58** - Mapa de contorno COSY (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) do Composto 7

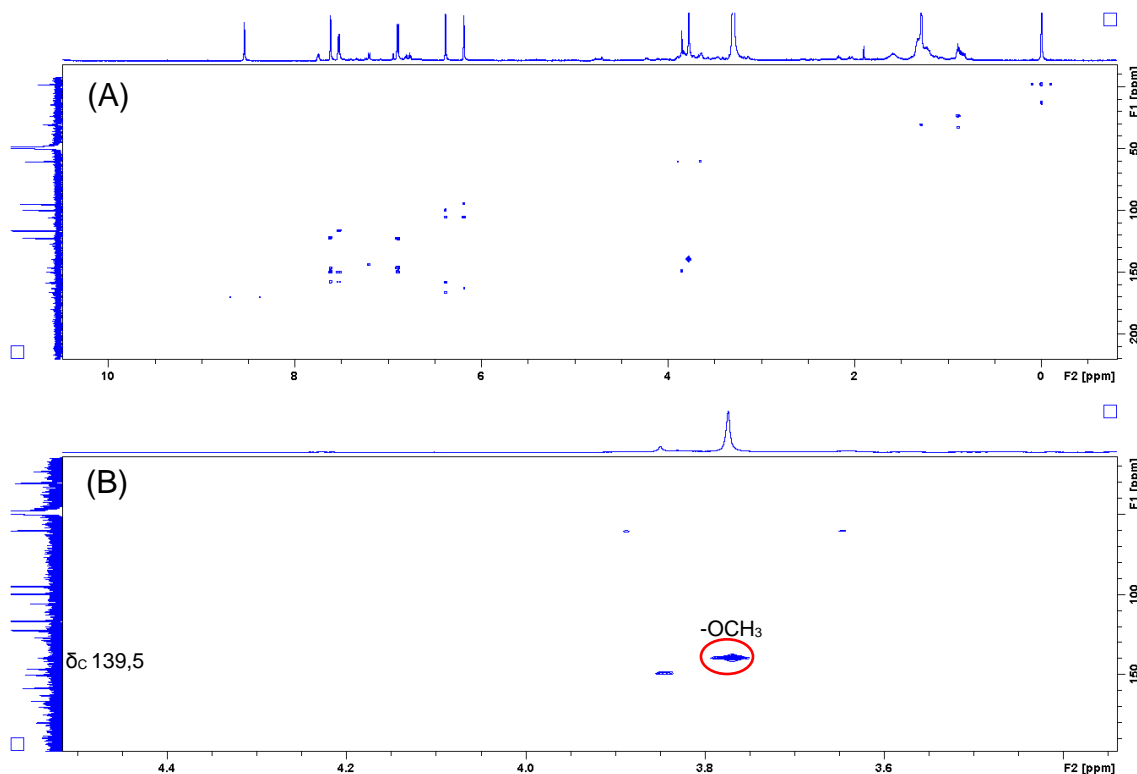


**Figura 59** - Mapa de correlação HSQC do Composto 7



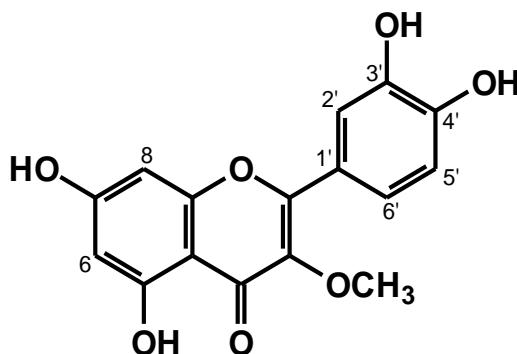
O singlete em  $\delta_H$  3,77 foi atribuído a metoxila ligada ao carbono C-3 [147-149], cuja posição pôde ser confirmada pela correlação observada no HMBC (Figura 60-B).

**Figura 60** - Mapa de correlação HMBC do Composto 7 (A, total) e sua expansão: (B) entre  $\delta_H$  4,5 e 3,4 e  $\delta_C$  190 e 40



Assim, na Figura 60-B foi observada a correlação a três ligações do sinal em  $\delta_H$  3,77 com o sinal em  $\delta_C$  139,5 característico do carbono C-3 do anel C do derivado de um flavonol metoxilado (Figura 61) [147-149].

**Figura 61** - Estrutura da quercetina-3-O-metil

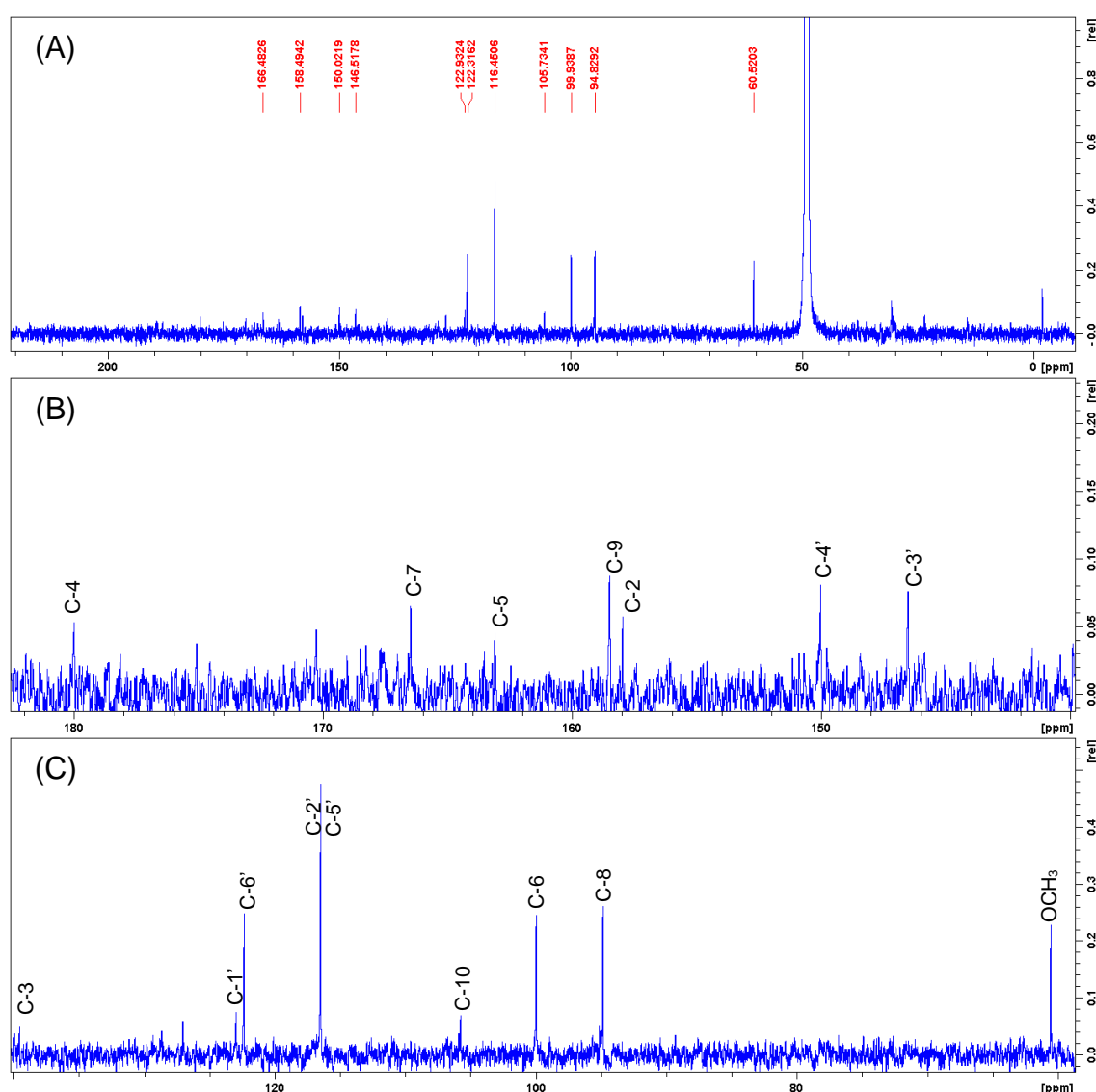


O espectro de RMN  $^{13}C$  (Figura 62) corrobora a determinação estrutural feita, pois apresenta sinais característicos do anel flavonoídico. O carbono C-4, referente à carbonila, apresentou deslocamento químico em  $\delta_C$  179,9 típico do



derivado de um flavonol, o qual pôde também ser confirmado pelo sinal em  $\delta_C$  139,5 referente ao carbono C-3 oxigenado. Os demais carbonos oxigenados referentes aos anéis A e B apareceram em  $\delta_C$  163,1; 166,4; 146,5 e 150,0 que foram atribuídos aos carbonos C-5, C-7, C-3' e C-4', respectivamente, caracterizando o padrão da quercetina da parte aglicona. O sinal de carbono típico da metoxila, ligada ao carbono C-3, pôde ser observado em  $\delta_C$  60,5.

**Figura 62** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) do Composto 7 (A, total) e suas expansões: (B) entre  $\delta_C$  182 e 140; (C) entre  $\delta_C$  140 e 60



A Tabela 11 mostra os valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos, os quais puderam ser atribuídos pela análise dos

espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC e por comparação com dados da literatura [147, 149].

**Tabela 11** - Deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos do composto 7 comparados com dados da literatura

Composto 7				Wang [147]	
Carbono	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> )	HMBC	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>m</i> ; <i>J</i> )
2	157,9	-	H-2', 6'	155,8	-
3	139,5	-	-	137,8	-
4	179,9	-	-	178,0	-
5	163,1	-	H-6	161,4	-
6	99,9	6,18 ( <i>d</i> ; 1,5)	H-8	93,7	6,20 ( <i>d</i> ; 2,0)
7	166,4	-	H-6, 8	164,3	-
8	94,8	6,38 ( <i>d</i> ; 1,5)	H-6	98,7	6,41 ( <i>d</i> ; 2,1),
9	158,5	-	H-8	156,5	-
10	105,8	-	H-6, 8	104,3	-
1'	122,9	-	H-2', 5'	121,0	-
2'	116,4	7,61 ( <i>d</i> ; 1,8)	H-6'	115,6	7,56 ( <i>d</i> ; 2,2)
3'	146,5	-	H-2', 5'	145,4	-
4'	150,0	-	H-5', 2', 6'	148,9	-
5'	116,4	6,89 ( <i>d</i> ; 8,4)	H-6'	115,9	6,92 ( <i>d</i> ; 8,5)
6'	122,3	7,53 ( <i>dd</i> ; 8,4, 1,8)	H-2', 5'	120,7	7,40 ( <i>dd</i> ; 2,3 e 8,4)
-OCH <sub>3</sub>	60,5	3,77 ( <i>s</i> )	-	59,8	3,78 <i>s</i>

$\delta$ : Deslocamento químico (ppm); *m*: multiplicidade; *J* (Hz): Constante de Acoplamento

Finalmente, os dados confirmaram a determinação estrutural realizada para o composto 7, o qual refere-se à quercetina metoxilada (quercetina-3-O-metil).

Este composto já foi isolado em várias espécies do gênero *Croton*, tais como em *Croton echioides*, *Croton schiedeianus* e *Croton zehntineri* [150-152], sendo este, no entanto, o primeiro relato em *C. grewoides*.

Vale ressaltar que a literatura mencionou que este composto exibe atividade anticolinesterásica significativa, podendo ter potencial terapêutico para o tratamento na doença de Alzheimer [149], atividade antioxidante, [152], além de ser relatado como um forte anticancerígeno [153, 154].

### 5.5 Estudo da Citotoxicidade em Linhagens de Células Tumorais *in vitro*

As análises de citotoxicidade *in vitro* fazem parte de um *screening* inicial para verificar o potencial antitumoral dos extratos de *C. grewioides* frente a duas linhagens de células tumorais.

A Tabela 12 apresenta as porcentagens de inibição celular  $\pm$  erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata pelo método do Alamar blue após 72 horas de exposição com as células HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia humana).

As amostras foram testadas na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , sendo a doxorrubicina (25  $\mu\text{g/mL}$ ) usada como controle positivo. Amostras com inibição acima de 75% são consideradas ativas e são selecionadas para o cálculo do valor de  $\text{IC}_{50}$ .

**Tabela 12** - Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais

Porcentagem de inibição (%)			Porcentagem de inibição (%)		
Amostra	HepG2	HL-60	Amostra	HepG2	HL-60
101 DI	6,28 ± 2,08	15,22 ± 7,75	101 DV	3,57 ± 5,96	16,47 ± 4,37
107 DI	1,36 ± 0,42	18,73 ± 7,19	107 DV	7,16 ± 6,42	23,69 ± 5,77
113 DI	1,73 ± 0,98	3,02 ± 1,40	113 DV	6,70 ± 2,40	4,04 ± 1,16
126 DI	6,98 ± 1,11	4,98 ± 1,19	126 DV	1,42 ± 0,83	6,46 ± 1,79
101 HI	17,13 ± 4,43	5,53 ± 1,19	101 HV	16,90 ± 5,94	15,81 ± 7,03
107 HI	14,93 ± 5,26	22,22 ± 2,79	107 HV	23,39 ± 9,35	8,76 ± 1,34
113 HI	4,76 ± 1,94	14,41 ± 5,38	113 HV	18,03 ± 6,44	16,23 ± 5,46
126 HI	9,33 ± 7,91	14,99 ± 3,56	126 HV	8,70 ± 1,04	5,04 ± 1,05
101 MI	2,70 ± 1,24	26,12 ± 5,78	101 MV	3,59 ± 1,53	22,69 ± 7,20
107 MI	2,83 ± 1,86	15,44 ± 4,47	107 MV	11,29 ± 6,85	<b>49,26 ± 3,16</b>
113 MI	6,42 ± 2,67	2,94 ± 1,59	113 MV	13,18 ± 9,21	<b>29,64 ± 7,48</b>
126 MI	10,23 ± 1,89	<b>28,70 ± 6,73</b>	126 MV	1,78 ± 0,90	19,65 ± 5,82
<b>DOX</b>	<b>87,91 ± 5,56</b>	<b>91,28 ± 4,02</b>			

D, decocção; M, metanólico; H, hidroalcoólico; V, verão; I, inverno. HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana). Os valores de % são apresentados como a média ± desvio padrão de três repetições medidas pelo ensaio MTT após 72 horas de incubação. Todos os extratos foram testados na concentração de 50 µg/mL. DOX, Doxorubicina foi usada como controle positivo.

A utilização do método Alamar blue permite a análise que faz parte de um *screening* inicial para determinação do potencial anticâncer destas amostras. Segundo o Instituto Nacional do Câncer dos EUA (**NCI**), o *screening* inicial para extratos brutos é realizado numa concentração de 50 µg/mL, com o objetivo de selecionar os extratos que apresentam efeito antiproliferativo, com inibição de pelo menos 75% da proliferação da célula tumoral [155].

O Alamar blue, recentemente identificado como resazurina [156], é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como os sais de tetrazólio, o Alamar blue reduz-se quando em contato com células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/ célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/ célula viável). A redução do Alamar blue reflete a proliferação celular, o qual foi inicialmente utilizada para indicar

crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos [124] e atualmente apresenta várias aplicações.

A escolha desse tipo de teste traz benefícios, tais como: a redução no uso de testes que envolvam o sacrifício de animais e a obtenção de informações que permitem determinar quais amostras podem ser desconsideradas [157].

Como é necessária uma inibição de no mínimo 75% para que uma amostra seja considerada ativa, nenhuma das amostras testadas foram selecionadas para o cálculo do valor de  $IC_{50}$ .

No entanto, vale ressaltar que a amostra 107 MV (extrato metanólico do acesso 107 da coleta de verão) apresentou o maior percentual de inibição da proliferação celular contra a linhagem HL-60 com valor de 49,26%, sendo considerada a mais promissora, sugerindo que as bandas cromatográficas com tempo de retenção de 44,8; 45,6 e 52,6 minutos devem ser importantes para esta atividade uma vez que são bandas que caracterizam as amostras do grupo G7, em que também estão presentes as amostras 113MV e 126MI, no gráfico de *scores* (Figura 14), que apresentaram o segundo e o terceiro maior valor de inibição, 29,64 e 28,70%, respectivamente.

Além disso, pode-se supor que estas amostras devem apresentar diferentes quantidades relativas desses compostos em relação às amostras 107MI e 126MV que pertencem ao mesmo grupo no gráfico de *escores* (Figura 14), uma vez que estas duas últimas foram menos ativas do que as demais.

Como é possível perceber pelos perfis cromatográficos, os extratos metanólicos são constituídos de metabólitos secundários de alta, média e baixa polaridade. Assim, foi realizada uma partição líquido-líquido de todos os extratos metanólicos preparados para verificar se a separação dos compostos, baseado em sua polaridade, influenciaria no resultado da atividade antitumoral, levando em consideração alguns dados da literatura que demonstram um aumento na atividade antitumoral de frações em relação aos seus extratos de origem.

Ribeiro *et al.* [158] relataram um aumento significativo do efeito inibitório, contra algumas linhagens celulares (MDA-MB-435, SF-295, HCT-8), da partição éter de petróleo do extrato diclorometânico do caule da espécie *Kielmeyera rugosa* Choisy, quando comparado ao valor obtido pelo seu extrato

diclorometânico puro. O extrato diclorometânico puro apresentou porcentagens de inibição do crescimento celular de 23,0; 21,3 e 20,4%, enquanto a partição éter de petróleo apresentou porcentagens de inibição de 72,8; 92,3 e 80,3, respectivamente, para MDA-MB-435, SF-295 e HCT-8. Resultados similares foram obtidos para amostras provenientes da espécie *Hancornia speciosa* Gomes [158].

Estes resultados sugerem que nas partições pode-se encontrar uma maior concentração dos compostos ativos quando comparados aos seus extratos brutos. A Tabela 13 apresenta as porcentagens de inibição celular frente as duas células antitumorais das partições hexânicas e metanólicas obtidas após uma partição líquido-líquido.

**Tabela 13** - Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais, HepG2 and HL-60, das partições obtidas dos extratos metanólicos

Partições	Porcentagem de inibição (%)		Partições	Porcentagem de inibição (%)	
	HepG2	HL-60		HepG2	HL-60
101 MI- H	36,56 ± 8,42	67,07 ± 1,22	101 MV- H	28,92 ± 1,92	68,71 ± 6,98
101 MI- M	27,92 ± 7,45	55,78 ± 6,63	101 MV- M	18,00 ± 8,48	37,68 ± 5,14
107 MI- H	48,43 ± 9,22	<b>83,75 ± 1,20</b>	107 MV- H	38,18 ± 7,82	<b>92,93 ± 0,47</b>
107 MI- M	15,43 ± 1,22	36,03 ± 2,94	107 MV- M	19,87 ± 1,89	49,99 ± 3,76
113 MI- H	42,54 ± 7,68	62,78 ± 1,18	113 MV- H	63,71 ± 7,12	<b>84,43 ± 0,58</b>
113 MI- M	5,19 ± 2,04	37,25 ± 4,35	113 MV- M	38,21 ± 2,06	39,83 ± 0,40
126 MI- H	15,76 ± 4,03	68,13 ± 1,90	126 MV- H	15,73 ± 8,14	<b>84,66 ± 0,79</b>
126 MI- M	4,57 ± 3,98	35,18 ± 2,99	126 MV- M	15,50 ± 4,37	36,08 ± 1,18
<b>DOX</b>	<b>100,2 ± 1,80</b>	<b>98,27 ± 8,75</b>			

MI-H: Partição hexânica do extrato metanólico inverno; MI-M: Partição metanólica do extrato metanólico inverno; MV-H: Partição hexânica do extrato metanólico verão; MV-M: Partição metanólica do extrato metanólico verão. HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana). Os valores de % são apresentados como a média ± desvio padrão de três repetições medidas pelo ensaio MTT após 72 horas de incubação. Todas as partições foram testadas na concentração de 50 µg/mL. DOX, Doxorubicina foi usada como controle positivo.

Como pode ser observado na Tabela 13, com exceção dos resultados obtidos pelas partições metanólicas de 113MI (113 MI-M) e 126MI (126 MI-M) contra a linhagem de células tumorais HepG2, todas as outras partições apresentaram maior porcentagem inibitória em relação aos seus respectivos extratos originais contra as duas linhagens celulares testadas. Entre eles, é possível destacar os valores exibidos pelas partições hexânicas 107MV-H, 107MI-H, 113MV-H e 126MV-H, que apresentaram 92,93; 83,75; 84,43 e 84,66% de inibição, respectivamente, contra o HL-60. Esses dados corroboram os citados acima, em que foi sugerido que os compostos eluídos em 44,8; 45,6 e 52,6 minutos são importantes para esta atividade. Por fim, por apresentarem um percentual de inibição da proliferação celular maior do que 75%, elas foram selecionadas para o cálculo do valor de IC<sub>50</sub>.

## **5.6 Estudo da Atividade de Inibição Enzimática *in vitro* Frente a Enzima Acetilcolinesterase (AChE)**

Os ensaios anticolinesterásicos foram baseados na obtenção de inibidores da AChE que alteram a função colinérgica central inibindo as enzimas que degradam a acetilcolina. A Tabela 14 apresenta os percentuais de inibição da atividade da AChE pelos extratos aquosos (na forma de decocção), hidroalcoólicos e metanólicos de *Croton grewioides* Baill. dos quatro acessos na concentração de 200 µg/mL, tendo a galantamina como controle positivo.

**Tabela 14** - Atividade inibidora da acetilcolinesterase dos extratos de *C. grewoides*

<b>Amostra<sup>a</sup></b>	<b>% inibição ± DP<sup>c</sup></b>	<b>Amostra<sup>a</sup></b>	<b>% inibição ± DP<sup>c</sup></b>
	<b>ICER-AChE<sub>ee</sub></b>		<b>ICER-AChE<sub>ee</sub></b>
<b>101DI</b>	9,0 ± 1,4	<b>101DV</b>	19,3 ± 5,5
<b>107DI</b>	11,9 ± 0,5	<b>107DV</b>	18,5 ± 4,0
<b>113DI</b>	<b>34,5 ± 1,2</b>	<b>113DV</b>	24,3 ± 2,8
<b>126DI</b>	18,3 ± 5,0	<b>126DV</b>	21,9 ± 0,4
<b>101HI</b>	29,3 ± 2,1	<b>101HV</b>	22,5 ± 0,6
<b>107HI</b>	10,4 ± 2,0	<b>107HV</b>	14,0 ± 2,8
<b>113HI</b>	19,1 ± 1,5	<b>113HV</b>	24,3 ± 4,3
<b>126HI</b>	24,4 ± 0,3	<b>126HV</b>	16,8 ± 0,5
<b>101MI</b>	32,0 ± 4,9	<b>101MV</b>	23,9 ± 3,7
<b>107MI</b>	23,4 ± 2,7	<b>107MV</b>	13,1 ± 2,9
<b>113MI</b>	17,6 ± 0,7	<b>113MV</b>	27,4 ± 3,8
<b>126MI</b>	20,9 ± 0,7	<b>126MV</b>	15,5 ± 3,4
<b>Galantamina<sup>b</sup></b>	87,4 ± 2,2		

<sup>a</sup>DI- decocção inverno; DV- decocção verão; HI- hidroalcoólico inverno; HV- hidroalcoólico verão; MI- metanólico inverno e MV- metanólico verão. <sup>b</sup>Inibidor padrão de AChE (100 µM); <sup>c</sup>Média ± Desvio Padrão

Nenhum dos extratos avaliados mostrou-se inibidor da enzima acetilcolinesterase, sendo o maior valor apresentado pela amostra de 113DI com 34,5% de inibição.

Em um trabalho realizado por Vinutha et al. [159], foi proposto uma classificação dos extratos de plantas medicinais indianas analisados em inibidores potentes (>50% de inibição), inibidores moderados (30-50% de inibição) e inibidores fracos (< 30% de inibição). Baseando-se nesta classificação, pode-se considerar inibidores moderados as amostras 113DI (34,5%) e 101MI (32,0%). Os demais extratos avaliados podem ser considerados inibidores fracos.

Apesar de nenhum extrato ter mostrado atividade significativa contra a AChE, testes subsequentes das partições dos extratos metanólicos (verão e inverno) também foram avaliados, a fim de investigar o potencial inibitório dos



constituintes presentes nesta espécie. Diferentemente dos resultados nos testes antitumorais, as partições dos extratos metanólicos não apresentaram aumento na atividade de inibição da AChE. A única partição que aumentou o valor da porcentagem de inibição foi a partição metanólica da amostra 113 MI (113 MI- M) com 39,7% de inibição. As outras partições tiveram seus valores abaixo de 10% de inibição.

## 6 CONCLUSÕES

A particularidade de cada acesso, bem como a influência da sazonalidade e do método de extração no perfil químico de *Croton grewoides* Baill. puderam ser avaliadas, após análise dos dados cromatográficos utilizando ferramentas quimiométricas. Assim, apenas o perfil químico dos extratos metanólicos dos acessos 101 e 113 mostraram ser influenciados pela sazonalidade. Por outro lado, em relação ao método de extração, os perfis químicos dos extratos hidroalcoólicos e decocção de todos os acessos foram semelhantes, diferindo de seus respectivos extratos metanólicos.

A cromatografia líquida semipreparativa foi útil no isolamento de três constituintes fixos do extrato aquoso (decocção) das folhas do acesso 107 da coleta de verão desta espécie. Com o auxílio dos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (uni e bidimensionais) e por comparação com os dados da literatura, foi possível a determinação estrutural destes compostos, sendo eles: a quercetina-3-O-[ $\alpha$ -ramnopiranosil-(1-2)- $\alpha$ -ramnopiranosil-(1-6)- $\beta$ -glicopiranosídeo], quercetina-3-O-glicosídeo e quercetina-3-O-metil. Com isso, foi possível contribuir para o conhecimento químico desta espécie, visto que nenhuma delas havia sido anteriormente isolada de *C. grewoides* sendo que, até o momento, a quercetina tri-glicosilada não foi encontrada nem mesmo em espécies da família Euphorbiaceae.

Os extratos e partições de extratos metanólicos foram avaliados contra duas diferentes linhagens de células tumorais (HepG2 e HL-60) e frente a enzima acetilcolinesterase. No entanto, nenhum dos extratos apresentou valores percentuais significativos de inibição em ambos os testes. Por outro lado, quatro partições hexânicas foram consideradas ativas frente a linhagem celular HL-60, mostrando valores acima de 80% de inibição.

Por fim, este estudo permitiu conhecer a classe de metabólitos secundários comumente encontrada nesta espécie e avaliar como a época de coleta do material vegetal e o método de extração influenciaram suas atividades biológicas. Assim, o uso dessa metodologia auxiliou no direcionamento quanto ao isolamento de produtos naturais que podem vir a ser utilizados para fins medicinais.

## 7 TRABALHOS EM ANDAMENTO

- ✓ Análise do potencial antioxidante dos extratos de *C. grewioides*;
- ✓ Cálculo do valor de IC<sub>50</sub> para as amostras consideradas ativas;
- ✓ Teste anticolinesterásico dos compostos isolados;
- ✓ Identificação dos demais constituintes isolados pelos espectros de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D.

## 8 REFERÊNCIAS

- [1] Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* **2006**, 27, 1-93.
- [2] Gahukar, R.T. Evaluation of plant-derived products against pests and diseases of medicinal plants: A review. *Crop Prot.* **2012**, 42, 202-209.
- [3] Marques, A. M.; Provance Jr. D. W.; Kaplan, M. A. C.; Figueiredo, M. R. *Echinodorus grandiflorus*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, doi: 10.1016/j.fct.2017.03.026.
- [4] Agra, M. F.; Silva, K. N.; Basílio, I. J. L. D.; Freitas, P. F.; Barbosa-Filho, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Braz. J. Pharm.* **2008**, 18, 472-508.
- [5] Albuquerque, U. P.; Medeiros, P. M.; Almeida, A. L. S.; Monteiro, J. M.; Lins-Neto, E. M. F.; Melo, J. G.; Santos, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, 114, 325-354.
- [6] Brasil, Ministério da Saúde. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde **2006**, 60 p.
- [7] Leitão, F.; Leitão, S. G.; Fonseca-Kruel, V. S.; Silva, I. M.; Martins, K. Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: an overview on their botanical diversity and toxicological potential. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2014**, 24, 225-247.
- [8] Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. Plantas Medicinais: Fatores que influencia no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova* **2007**, 30, 374-381.

- [9] Bezerra, D. P.; Marinho-Filho, J. D. B.; Alves, A. P. N. N.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Pessoa, O. D. L.; Torres, M. C. M.; Silveira, E. R.; Viana, F. A.; Costa-Lotufo, L. V. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. *Chem. Biodivers.* **2009**, 6, 1224-1231.
- [10] Custers, D.; Praag, N. V.; Courselle, P.; Apers, S.; Deconinck, E. Chromatographic fingerprinting as a strategy to identify regulated plants in illegal herbal supplements. *Talanta* **2017**, 164, 490-502.
- [11] Martins, L. R. R.; Pereira-Filho, E. R.; Cass, Q. B. Chromatographic profiles of *Phyllanthus* aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 400, 469-481.
- [12] Jiménez-Carvelo, A. M.; Pérez-Castaño, E.; González-Casado, A.; Cuadros-Rodríguez, L. One input-class and two input-class classifications for differentiating olive oil from other edible vegetable oils by use of the normal-phase liquid chromatography fingerprint of the methyl-transesterified fraction. *Food Chem.* **2017**, 221, 1784-1791.
- [13] Cuadros-Rodríguez, L.; Ruiz-Samblás, C.; Valverde-Som, L.; Pérez-Castaño, E.; González-Casado, A. Chromatographic fingerprinting: An innovative approach for food 'identification' and food authentication - A tutorial. *Anal. Chim. Acta* **2016**, 909, 9-23.
- [14] Goodarzi, M.; Russell, P. J.; Heyden, Y. V. Similarity analyses of chromatographic herbal fingerprints: A review. *Anal. Chim. Acta* **2013**, 804, 16-28.
- [15] Hakimzadeh, N.; Parastar, H.; Fattahi, M. Combination of multivariate curve resolution and multivariate classification techniques for comprehensive high-performance liquid chromatography-diode array absorbance detection fingerprints analysis of *Salvia reuterana* extracts. *J. Chromatogr. A.* **2014**, 1326, 63-72.

- [16] Granato, D.; Santos, J. S.; Escher, G. B.; Ferreira, B. L.; Maggio, R. M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, 72, 83-90. doi: 10.1016/j.tifs.2017.12.006.
- [17] Alvarez-Zapata, R.; Sánchez-Medina, A.; Chan-Bacab, M.; García-Sosa, K.; Escalante-Erosa, F.; García-Rodríguez, R. V.; Peña-Rodríguez, L. M. Chemometrics-enhanced high performance liquid chromatography-ultraviolet detection of bioactive metabolites from phytochemically unknown plants. *J. Chromatogr. A* **2015**, 1422, 213-221. doi:10.1016/j.chroma.2015.10.026.
- [18] Bansal, A.; Chhabra, V.; Rawal, R. K.; Sharman, S. Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. *J. Pharmaceut Anal.* **2014**, 4, 223-233.
- [19] Gómez-Caravaca, A. M.; Maggio, R. M.; Cerretani, L. Chemometric applications to assess quality and critical parameters of virgin and extra-virgin olive oil. A review. *Anal. Chim. Acta* **2016**, 913, 1-21.
- [20] Calvo, N. L.; Maggio, R. M.; Kaufman, T. S. Characterization of pharmaceutically relevant materials at the solid state employing chemometrics methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, 147, 538-564.
- [21] Esteki, M.; Simal-Gandara, J.; Shahsavari, Z.; Zandbaaf, S.; Dashtaki, E.; Vander Heyden, Y. A review on the application of chromatographic methods, coupled to chemometrics, for food authentication. *Food Control* **2018**, 93, 165-182. doi:10.1016/j.foodcont.2018.06.015.
- [22] Kumar, N.; Bansal, A.; Sarma, G. S.; Rawal, R. K. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. *Talanta* **2014**, 123, 186-199.
- [23] Kong, W-J.; Zhao, Y-L.; Xiao, X-H.; Jin, C.; Li, Z-L. Quantitative and chemical fingerprint analysis for quality control of *Rhizoma Coptidis chinensis*

based on UPLC-PAD combined with chemometrics methods. *Phytomedicine* **2009**, 16, 950-959.

[24] Viapiana, A.; Struck-Lewicka, W.; Konieczynski, P.; Wesolowski, M.; Kaliszan, R. An approach based on HPLC-fingerprint and chemometrics to quality consistency evaluation of *Matricaria chamomilla* L. commercial samples. *Front Plant Sci.* **2016**, 7, 1-11. doi:10.3389/fpls.2016.01561.

[25] Iwaniak, A.; Minkiewicz, P.; Darewicz, M.; Protasiewicz, M.; Mogut, D. Chemometrics and cheminformatics in the analysis of biologically active peptides from food sources. *J. Funct. Foods* **2015**, 16, 334-351.

[26] McKenzie, J. S.; Donarski, J. A.; Wilson, J. C.; Charlton, A. J. Analysis of complex mixtures using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2011**, 59, 336-359.

[27] Liu, Y. J.; Tran, T.; Postma, G.; Buydens, L. M. C.; Jansen, J. Estimating the number of components and detecting outliers using Angle Distribution of Loading Subspaces (ADLS) in PCA analysis. *Anal. Chim. Acta* **2018**, 1020, 17-29.

[28] Oliveira, L. P.; Pinheiro, R. C.; Vieira, M. S.; Paula, J. R.; Bara, M. T. F.; Valadares, M. C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2010**, 20, 201-207.

[29] Jacobo-Herrera, N. J.; Jacobo-Herrera, F. E.; Zentella-Dehesa, A.; Andrade-Cetto, A.; Heinrich, M.; Pérez-Plasencia, C. Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, 179, 391-402.

[30] Chapuis', J-C.; Sorsat, B.; Hostettmann', K. Screening for cytotoxic activity of plants used in tradicional medicine. *J. Ethnopharmacol.* **1988**, 23, 273-334.

- [31] Savietto, J. P.; Furlan, C. M.; Motta, L. B.; Salatino, M. L. F.; Carvalho, J. E.; Ruiz, A. L. T. G.; Salatino, A.; Santos, D. Y. A. C. Antiproliferative activity of methanol extracts of four species of *Croton* on different human cell lines. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2013**, 23, 662-667.
- [32] Valadares, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a “era do teste DL50”. *Rev. Eletr. Farm.* **2006**, 3, 93-98.
- [33] Purchase, I. F. H.; Botham, P. A.; Bruner, L. H.; Flint, O. P.; Frazier, J. M.; Stokes, W. S. Workshop overview: Scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. *Toxicol. Sci.* **1998**, 43, 86-101.
- [34] Nascimento, S. C.; Pereira, E. C.; Oliveira, A. F. M.; Silva, N. H.; Boitard, M.; Beriel, H. Screening de atividade citotóxica de extratos liquênicos: Cladoniaceae. *Acta Bot. Bras.* **1994**, 8, 97-108.
- [35] Harbell, J. W.; Koontz, S. W.; Lewis, R. W.; Lovell, D.; Acosta, D. Cell cytotoxicity assays. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, 35, 79-126.
- [36] Morales, A.; Pérez, P.; Mendoza, R.; Compagnone, R.; Suarez, A. I.; Arvelo, F.; Ramírez, J. L.; Galindo-Castro, I. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 $\beta$ -17 $\alpha$ -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cancer Lett.* **2005**, 218, 109-116.
- [37] Schiar, V. P. P.; Santos, D. B.; Lüdtke, D. S.; Vargas, F.; Paixão, M. W.; Nogueira, C. W.; Zeni, G.; Rocha, J. B. T. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. *Toxicol. in vitro* **2007**, 21, 139-145.
- [38] Meireles, D. R. P.; Fernandes, H. M. B.; Rolim, T. L.; Batista, T. M.; Manguiera, V. M.; Sousa, T. K. G.; Pita, J. C. L. R.; Xavier, A. L.; Beltrão, D. M.; Tavares, J. F.; Silva, M. S.; Medeiros, K. K. P.; Sobral, M. V. Toxicity and antitumor efficacy of *Croton polyandrus* oil against Ehrlich ascites carcinoma cells. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2016**, 26, 751-758.



- [39] Sylvestre, M.; Pichette, A.; Longtin, A.; Nagau, F.; Legault, J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, 103, 99-102.
- [40] Kim, J. H.; Lee, S. J.; Han, Y. B.; Moon, J. J.; Kim, J. B. Isolation of Isoguanosine from *Croton tiglium* and its antitumor activity. *Arch. Pharm. Res.* **1994**, 17, 115-118.
- [41] Adewusi, E. A.; Moodley, N.; Steenkamp, V. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *S. Afr. J. Bot.* **2011**, 77, 638-644.
- [42] Mota, W. M.; Barros, M. L.; Cunha, P. E. L.; Santana, M. V. A.; Stevam, C. S.; Leopoldo, P. T. G.; Fernandes, R. P. M. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. *Rev. Bras. Pl. Med.* **2012**, 14, 624-628.
- [43] Carvalho, R. B. F.; Almeida, A. A. C.; Freitas, R. M.; Lima, L. S.; David, J. P.; David, J. M.; Feitosa, C. M. Composição química e atividade anticolinesterásica de uma fração ativa do extrato de folhas de *Citrus limon* (L.) Burm. *Quim. Nova* **2013**, 36, 1375-1379.
- [44] Yamaguchi, K. K. L.; Alcântara, J. M.; Veiga-Junior, V. F. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. *Acta Amaz.* **2012**, 42, 541-546.
- [45] Rhee, I. K.; Van de Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chromatogr. A.* **2001**, 915, 217-223.
- [46] Morais, S. M.; Lima, K. S. B.; Siqueira, S. M. C.; Cavalcanti, E. S. B.; Souza, M. S. T.; Menezes, J. E. S. A.; Trevisan, M. T. S. Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos

de plantas medicinais de farmácias vivas. *Rev. Bras. Pl. Med.* **2013**, 15, 575-582.

[47] Da Silva, J. I.; Moraes, M. C.; Vieira, L. C. C.; Corrêa, A. G.; Cass, Q. B.; Cardoso, C. L. Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, 73, 44-52.

[48] Aremu, A. O.; Amoo, S. O.; Ndhlala, A. R.; Finnie, J. F.; Van Staden, J. Antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibition, iridoid content and mutagenic evaluation of *Leucosidea sericea*. *Food Chem Toxicol.* **2011**, 49, 1122-1128.

[49] Aderogba, M. A.; Ndhlala, A. R.; Van Staden, J. Acetylcholinesterase inhibitory activity and mutagenic effects of *Croton penduliflorus* leaf extract constituents. *S. Afr. J. Bot.* **2013**, 87, 48-51.

[50] Queiroz, M. M. F.; Queiroz, E. F.; Zeraik, M. L.; Marti, G.; Favre-Godal, Q.; Simões-Pires, C.; Marcourt, L.; Carrupt, P.A.; Cuendet, M.; Paulo, M.Q.; Bolzani, V.S.; Wolfender, J. L. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. *Phytochem. Lett.* **2014**, 10, 88-93.

[51] Crepaldi, C. G.; Campos, J. L. A.; Albuquerque, U.P.; Sales, M.F. Richness and ethnobotany of the family Euphorbiaceae in a tropical semiarid landscape of Northeastern Brazil. *S. Afr. J. Bot.* **2016**, 102, 157-165.

[52] Lucena, M. F. A.; Alves, M. Notas taxonômicas para Euphorbiaceae s.l. do Nordeste do Brasil. *Hoehnea* **2010**, 37, 71-85.

[53] Webster, G. L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **1994**, 81, 33-144.

- [54] Trindade, M. J. S.; Lameira, O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. *RCPM (Revista Cubana de Plantas Medicinales)* **2014**, 19, 292-309.
- [55] Oliveira, D. G. A família Euphorbiaceae Juss. em um fragmento de caatinga em Sergipe. *Sci. Plena* **2013**, 9, 1-7.
- [56] Sátiro, L. N.; Roque, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. *Acta bot. bras.* **2008**, 22, 99-118.
- [57] Coutinho, D. J. G.; Barbosa, M. O.; Souza, R. J. C.; Silva, A. S.; Silva, S. I.; Oliveira, A. F. M. Biodiesel potential of the seed oils from some Brazilian native Euphorbiaceae species. *Renew. Energy* **2016**, 91, 275-281.
- [58] Costa, M. P.; Magalhães, N. S. S.; Gomes, F. E. S.; Maciel, M. A. M. Uma revisão das atividades biológicas da *trans*-desidrocrotonina, um produto natural obtido de *Croton cajucara*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, 17, 275-286.
- [59] Secco, R. S.; Cordeiro, I.; Senna-Vale, L.; Sales, M. F.; Lima, L. R.; Medeiros, D.; Haiad, B. S.; Oliveira, A. S.; Caruzo, M. B. R.; Carneiro-Torres, D.; Bigio, N. C. Panorama dos recentes estudos taxonômicos em Euphorbiaceae s.l. no Brasil. *Rodriguésia* **2012**, 63, 227-242.
- [60] Alves, M. V. Checklist das espécies de Euphorbiaceae Juss. Ocorrentes no semi-árido Pernambucano, Brasil. *Acta bot. bras.* **1998**, 12, 485-495.
- [61] Lucena, M. F. A.; Sales, M. F. Tricomas foliares em espécies de *Croton* L. (Crotonoideae-Euphorbiaceae). *Rodriguésia* **2006**, 57, 11-25.
- [62] Silva, J. S.; Sales, M. F.; Carneiro-Torres, D. S. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. *Rodriguésia* **2009**, 60, 879-901.

- [63] Ravanelli, N.; Santos, K. P.; Motta, L. B.; Lago, J. H. G.; Furlan, C.M. Alkaloids from *Croton echinocarpus* Baill.: Anti-HIV potential. *S. Afr. J. Bot.* **2016**, 102, 153-156.
- [64] Lopes, E. L.; Neto, M. A.; Silveira, E. R.; Pessoa, O. D. L.; Braz-Filho, R.; Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. *Quim. Nova* **2012**, 35, 2169-2172.
- [65] Palmeira Júnior, S. F.; Alves, V. L.; Moura, F. S.; Vieira, L. F. A.; Conserva, L. M.; Lemos, R. P. L. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, 16, 397-402.
- [66] Medeiros, V. M. Estudo fitoquímico de *Croton grewioides* Baill. e revisão da ocorrência das principais classes de metabólitos do gênero *Croton*. Ph.D. Tese, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB, 2012.
- [67] Silva, C. G. V.; Zago, H. B.; Júnior, H. J. G. S.; Camara, C. A. G.; Oliveira, J. V. Barros, R.; Schwartz, M. O. E.; Lucena, M. F. A. Composition and insecticidal activity of the essential oil of *Croton grewioides* Baill. against Mexican Bean Weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boheman). *J. Essent. Oil Res.* **2008**, 20, 178-182.
- [68] Silva, A. D. S.; Silva, K. M.; Neto, J. C.; Costa, V. C. O.; Pessôa, H. L. F.; Tavares, J. F.; Silva, M. S.; Cavalcante, F. A. *Croton grewioides* Baill. (Euphorbiaceae) shows antidiarrheal activity in mice. *Pharmacogn. Res.* **2016**, 8, 202-205.
- [69] Lavor, A. K. L.S.; Matias, E. F. F.; Alves, E. F.; Santos, B. S.; Figueredo, F. G.; Lima, L. F.; Leite, N. F.; Sobral-Souza, C. E.; Andrade, J. C.; Alencar, L. B. B.; Brito, D. I. V.; Albuquerque, R. S.; Coutinho, H. D.M. Association between drugs and herbal products: *In vitro* enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A.(Euphorbiaceae). *Eur. J. Integr. Med.* **2014**, 6, 301-306.

- [70] Webster G. L.; Del-Arco-Aguilar, M. J.; Smith, B. A. Systematic distribution of foliar trichome types in *Croton* (Euphorbiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **1996**, 121, 41-57.
- [71] Vitarelli, N. C.; Riina, R.; Cassino, M. F.; Meira, R. M. S. A. Trichome-like emergences in *Croton* of Brazilian highland rock outcrops: Evidences for atmospheric water uptake. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* **2016**, 22, 23-35.
- [72] Ramos, F.; Takaishi, Y.; Kashiwada, Y.; Osorio, C.; Duque, C.; Acuña, R.; Fujimoto, Y. *Ent*-3,4-seco-labdane and *ent*-labdane diterpenoids from *Croton stipuliformis* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* **2008**, 69, 2406-2410.
- [73] Yuan, W.; Zhong-Mei, Z. Sesquiterpenes from the stems of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. *Chin. J. Nat. Med.* **2008**, 6, 339-341.
- [74] Martinsen, A.; Baccelli, C.; Navarro, I.; Abad, A.; Quetin-Leclercq, J.; Morel, N. Vascular activity of a natural diterpene isolated from *Croton zambesicus* and of a structurally similar synthetic trachylobane. *Vascul. Pharmacol.* **2010**, 52, 63-69.
- [75] Peres, M. T. L. P.; Pizzolatti, M. G.; Yunes, R. A.; Monache, F. D. Clerodane diterpenes of *Croton Ururucana*. *Phytochemistry* **1998**, 49, 171-174.
- [76] Ngadjua, B. T.; Folefoc, G. G.; Keumedjio, F.; Dongo, E.; Sondengam, B. L.; Connolly, J. D. Crotonadiol, a labdane diterpenoid from the stem bark of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry* **1999**, 51, 171-174.
- [77] Salatino, A.; Salatino, M. L. F.; Negri, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, 18, 11-33.
- [78] Rossi, D.; Guerrini, A.; Maietti, S.; Bruni, R.; Paganetto, G.; Poli, F.; Scalvenzi, L.; Radice, M.; Saro, K.; Sacchetti, G. Chemical *fingerprinting* and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae)

stem bark essential oil: A new functional food ingredient? *Food Chem.* **2011**, 126, 837-848.

[79] Babili, F. El.; Moulis, C.; Bon, M.; Respaud, M.-J.; Fourasté, I. Three furano-diterpenos from the bark of *Croton Campestris*. *Phytochemistry* **1998**, 48, 165-169.

[80] Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Brabo, S. N.; Silva, M. N. Terpenoids from *Croton Cajucara*. *Phytochemistry* **1998**, 49, 823-828.

[81] Kubo, I.; Asaka, Y.; Shibata, K. Insect growth inhibitory nor-diterpenes, *cis*-dehydrocrotonin and *trans*-dehydrocrotonin, from *Croton Cajucara*. *Phytochemistry* **1991**, 30, 2545-2546.

[82] Campos, M. C. O.; Salomão, K.; Castro-Pinto, D. B.; Leon, L. L.; Barbosa, H. S.; Maciel, M. A. M.; Castro, S. L. *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: activity on *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* **2010**, 107, 1193-1204.

[83] Lima, G. S.; Castro-Pinto, D. B.; Machado, G. C.; Maciel, M. A. M.; Echevarria, A. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). *Phytomedicine* **2015**, 22, 1133-1137.

[84] Pereira, S.; Taleb-Contini, S.; Coppede, J.; Pereira, P.; Bertoni, B.; França, S.; Pereira, A. M. An *ent*-kaurane-type diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. *Molecules* **2012**, 17, 8851-8858.

[85] Puebla, P.; López, J. L.; Guerrero, M.; Carrón, R.; Martín, M. L.; Román, L. S.; Feliciano, A. S. Neo-clerodane diterpenoids from *Croton schiedeanus*. *Phytochemistry* **2003**, 62, 551-555.

[86] Block, S.; Baccelli, C.; Tinant, B.; Meervelt, L. V.; Rozenberg, R.; Jiwan, J. L. H.; Llabrès, G.; Pauw-Gillet, M. C.; Quetin-Leclercq, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry* **2004**, 65, 1165-1171.

- [87] Tane, P.; Tatsimo, S.; Connolly, J. D. Crotomacrine, a new clerodane diterpene from the fruits of *Croton macrostachyus*. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 6997-6998.
- [88] Pan, Z.; Ning, D.; Wu, X.; Huang, S.; Li, D.; Lv, S. New clerodane diterpenoids from the twigs and leaves of *Croton Euryphyllus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 1329-1332.
- [89] Zhang, D.-D.; Zhou, B.; Yu, J.-H.; Xu, C.-H.; Ding, J.; Zhang, H.; Yue, J.-M. Cytotoxic tiglane-type diterpenoids from *Croton tiglium*. *Tetrahedron* **2015**, 71, 9638-9644.
- [90] Wang, H. B.; Wang, X. Y.; Liu, L. P.; Qin, G. W.; Kang, T. G. Tiglane diterpenoids from the *Euphorbiaceae* and *Thymelaeaceae* Families. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 2975-3011.
- [91] Zhao, B.-Q.; Peng, S.; He, W.-J.; Liu, Y.-H.; Wang, J.-F.; Zhou, X.-J. Antitubercular and cytotoxic tiglane-type diterpenoids from *Croton tiglium*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 4996-4999.
- [92] Sun, Y.; Wang, M.; Ren, Q.; Li, S.; Xu, J.; Ohizumi, Y.; Xie, C.; Jin, D.-Q.; Guo, Y. Two novel clerodane diterpenes with NGF-potentiating activities from the twigs of *Croton yanhuii*. *Fitoterapia* **2014**, 95, 229-233.
- [93] Qiu, M.; Cao, D.; Gao, Y.; Li, S.; Zhu, J.; Yang, B.; Zhou, L.; Zhou, Y.; Jin, J.; Zhao, Z. New clerodane diterpenoids from *Croton crassifolius*. *Fitoterapia* **2016**, 108, 81-86.
- [94] Yang, L.; Zhang, Y.-B.; Chen, L.-F.; Chen, N.-H.; Wu, Z.-N.; Jiang, S.-Q.; Jiang, L.; Li, G.-Q.; Li, Y.-L.; Wang, G.-C. New labdane diterpenoids from *Croton laui* and their anti-inflammatory activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 4687-4691.

- [95] Tian, J.-L.; Yao, G.-D.; Wang, Y.-X.; Gao, P.-Y.; Wang, D.; Li, L.-Z.; Lin, B.; Huang, X.-X.; Song, S.-J. Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Croton crassifolius*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 1237-1242.
- [96] Tian, J.-L.; Yao, G.-D.; Zhang, Y.-Y.; Lin, B.; Zhang, Y.; Li, L.-Z.; Huang, X.-X.; Song, S.-J. Pyran-2-one derivatives from *Croton crassifolius* as potent apoptosis inducers in HepG2 cells via p53-mediated Ras/Raf/ERK pathway. *Bioorg. Chem.* **2018**, 79, 355-362.
- [97] Barreto, M. B.; Gomes, C. L.; Freitas, J. V. B.; Pinto, F. C. L.; Silveira, E. R.; Gramosa, N. V. Flavonoides e terpenoides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). *Quim. Nova* **2013**, 36, 675-679.
- [98] Huber, L. S.; Rodriguez-Amaya, D. B. Flavonóis e flavonas: Fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. *Alim. Nutr.* **2008**, 19, 97-108.
- [99] Hoffmann-Ribani, R.; Rodriguez-Amaya, D. B. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. *Quim. Nova* **2008**, 31, 1378-1384.
- [100] Silva, L. R.; Martins, L. V.; Calou, I. B. F.; Deus, M. S. M.; Ferreira, P. M. P.; Peron, A. P. Flavonoides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. *Acta Toxicol. Argent.* 2015, 23, 36-43.
- [101] Santos, D. S.; Rodrigues, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. *Estação Científica (UNIFAP)*, Macapá, 2017, 7, 29-35.
- [102] Grotewold, E. *The science of flavonoids*. Springer Science+Business Media, Inc. New York, 2006.



- [103] Yang, B.; Liu, H.; Yang, J.; Gupta, V. K.; Jiang, Y. New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, 79, 116-124.
- [104] Pereira, I. S. P.; Rodrigues, V. F.; Vega, M. R. G. Flavonoides do gênero *Solanum*. *Rev. Virtual Quim.* **2016**, 8, 4-26.
- [105] Forkmann, G.; Martens, S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Plant Biotechnol.* **2001**, 12, 155-160.
- [106] Sisa, M.; Bonnet, S. L.; Ferreira, D.; Van der Westhuizen, J. H. Photochemistry of flavonoids. *Molecules*, **2010**, 15, 5196-5245.
- [107] Wang, D.; Tang, W.; Yang G-M.; Cai B-C. Anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxic activities of flavonoids from *Oxytropis falcata* Bunge. *Chin. J. Nat. Med.* **2010**, 8, 461-465.
- [108] Kupcewicz, B.; Małecka, M.; Zapadka, M.; Krajewska, U.; Rozalski, M.; Budzisz, E. Quantitative relationships between structure and cytotoxic activity of flavonoid derivatives. An application of Hirshfeld surface derived descriptors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 3336-3341.
- [109] Dzoyem, J. P.; Tchamgoue, J.; Tchouankeu, J. C.; Kouam, S. F.; Choudhary, M. I.; Bakowsky, U. Antibacterial activity and cytotoxicity of flavonoids compounds isolated from *Pseudarthria hookeri* Wight & Arn. (Fabaceae). *S. Afr. J. Bot.* **2018**, 114, 100-103.
- [110] Vukovic, N. L.; Obradovic, A. D.; Vukic, M. D.; Jovanovic, D.; Djurdjevic, P. M. Cytotoxic, proapoptotic and antioxidative potential of flavonoids isolated from propolis against colon (HCT-116) and breast (MDA-MB-231) cancer cell lines. *Food Res. Int.* **2018**, 106, 71-80.
- [111] Marzouk, M. M. Flavonoid constituents and cytotoxic activity of *Erucaria hispanica* (L.) Druce growing wild in Egypt. *Arab. J. Chem.* **2011**, 9, 1-5.

- [112] Souza, P. O. de; Bianchi, S. E.; Figueiró, F.; Heimfarth, L.; Moresco, K. S.; Gonçalves, R. M.; Hoppe, J. B.; Klein, C. P.; Salbego, C. G.; Gelain, D. P.; Bassani, V. L.; Zanotto-Filho, A.; Moreira, J. C. F. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. *Toxicol. In Vitro* **2018**, 51, 23-33.
- [113] Wang, T.; Li, Q.; Bi, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm. Sci.* **2018**, 13, 12-23.
- [114] Khan, H.; Marya; Amin, S.; Kamal, M. A.; Patel, S. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, 101, 860-870.
- [115] Fahmy, N. M.; Al-Sayed, E.; El-Shazly, M.; Singab, A. N. Comprehensive review on flavonoids biological activities of *Erythrina* plant species. *Ind. Crops Prod.* **2018**, 123, 500-538.
- [116] Dewick, P. M. *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*. 2nd ed.; John Wiley and Sons Ltd., UK, 2002.
- [117] Karam, T. K.; Dalposso, L. M.; Casa, D. M.; De Freitas, G. B. L. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. *Rev. Bras. Pl. Med.* **2013**, 15, 280-286.
- [118] Andersen, Ø. M.; Markham, K. R. *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*. Taylor & Francis, New York, 2006.
- [119] Silva, C. G.; Marinho, M. G. V.; Lucena, M. F. A.; Costa, J. G. M. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.* **2015**, 17, 133-142.

- [120] Figueiredo, W. R. S.; Oliveira, F. Q.; Oliveira, R.; Batista, J. L.; Brito, C. H. Bioactivity of oil from *Croton grewoides* on the control of Mediterranean fruit fly. *Eng. Amb.- Espírito Santo do Pinhal* **2010**, 7, 113-118.
- [121] Silva, J. S.; Sales, M. F.; Gomes, A. P. S.; Carneiro-Torres, D. S. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Bot. Bras.* **2010**, 24, 441-453.
- [122] Medeiros, V. M.; Nascimento, Y. M.; Souto, A. L.; Madeiro, S. A. L.; Costa, V. C. O.; Silva, S. M. P. M.; Silva, V. S. F.; Agra, M. F.; Siqueira-Júnior, J. P.; Tavares, J. F. Chemical composition and modulation of bacterial drug resistance of the essential oil from leaves of *Croton grewoides*. *Microb Pathog.* **2017**, 111, 468-471.
- [123] Skov, T.; Berg, F. V. D.; Tomasi, G.; Bro, R. Automated alignment of chromatographic data. *J. Chemom.* **2006**, 20, 484-497.
- [124] Ahmed, S. A.; Gogal, R. M.; Walsh, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods* **1994**, 170, 211-224.
- [125] Vilela, A. F. L.; Silva, J. I.; Vieira, L. C. C.; Bernasconi, G. C. R.; Corrêa, A. G.; Cass, Q. B.; Cardoso, C. L. Immobilized cholinesterases capillary reactors on-flow screening of selective inhibitors. *J. Chromatogr. B.* **2014**, 968, 87-93.
- [126] Vanzolini, K. L.; Vieira, L. C. C.; Corrêa, A. G.; Cardoso, C. L.; Cass, Q. B. Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors-tandem mass spectrometry: An on-flow tool for ligand screening. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 2038-2044.
- [127] Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. *Practical HPLC method development*, 2. ed. John Wiley and Sons, New York, 1997.

- [128] Snyder, L. R.; Dolan, J. W. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development I. Use of starting gradient run. *J. Chromatogr. A*. **1996**, 721, 3-14.
- [129] Lanças, F. M. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. Editora Átomo, Campinas, Brasil, 2009.
- [130] Lanças, F. M. Efeitos de temperatura em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). *Scientia Chromatogr.* **2012**, 4, 13-19.
- [131] Souza, A. M.; Poppi, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: Um tutorial, Parte I. *Quim. Nova* **2012**, 35, 223-229.
- [132] Lu, Y.; Gao, B.; Chen, P.; Charles, D.; Yu, L.(L). Characterisation of organic and conventional sweet basil leaves using chromatographic and flow-injection mass spectrometric (FIMS) fingerprints combined with principal component analysis. *Food Chem.* **2014**, 154, 262-268.
- [133] Sun, Z.; Zhao, L.; Cheng, N.; Xue, X.; Wu, L.; Zheng, J.; Cao, W. Identification of botanical origin of Chinese unifloral honeys by free amino acid profiles and chemometric methods. *J. Pharm Anal.* **2017**, 7, 317-323.
- [134] Pardo-Mates, N.; Vera, A.; Barbosa, S.; Hidalgo-Serrano, M.; Núñez, O.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Puignou, L. Characterization, classification and authentication of fruit-based extracts by means of HPLC-UV chromatographic fingerprints, polyphenolic profiles and chemometric methods. *Food Chem.* **2016**, 221, 29-38.
- [135] Zhang, L.; Liu, Y.; Wang, Y.; Xu, M.; Hu, X. UV–Vis spectroscopy combined with chemometric study on the interactions of three dietary flavonoids with copper ions. *Food Chem.* **2018**, 263, 208-215.

- [136] Arora, S.; Itankar, P. Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Chenopodium album* aerial parts. *J. Tradit. Complement. Med.* **2018**, *8*, 476-482.
- [137] Mabry, T.J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York, 1970.
- [138] Pereira, C.; Oliveira, L. L.; Gonçalves, R.; Amaral, A. C. F.; Kuster, R. M.; Sakuraguic, C. M. Phytochemical and phylogenetic analysis of *Spondias* (Anacardiaceae). *Quim. Nova* **2015**, *38*, 813-816.
- [139] Quispe, C.; Viveros-Valdez, E.; Yarleque, J. A.; Arones, M. R.; Paniagua, J. C.; Schmeda-Hirschmann, G. High speed centrifugal countercurrent chromatography (HSCCC) isolation and identification by LC-MS<sup>n</sup> analysis of the polar phenolics from *Vasconcellea quercifolia*. *J. Chil. Chem. Soc.* **2013**, *58*, 1830-1835.
- [140] Schwarz, B.; Hofmann, T. Sensory-guided decomposition of Red Currant Juice (*Ribes rubrum*) and structure determination of key astringent compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1394-1404.
- [141] Farias, L. S.; Mendez, A. S. L. LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata* subsp.*pruinosa*. *Quim. Nova* **2014**, *37*, 483-486.
- [142] Simirgiotis, M. J.; Caligari, P. D. S.; Schmeda-Hirschmann, G. Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography–UV detection–mass spectrometry. *Food Chem.* **2009**, *115*, 775-784.
- [143] Siewek, F.; Galensa, R.; Herrmann, K. Isolation and identification of a branched quercetin triglycoside from *Ribes rubrum* (Saxifragaceae). *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 1291-1293.

- [144] Agrawal, P. K. *Carbon-13 NMR of flavonoids* (studies in organic chemistry series, no. 39). (Ed.). Elsevier, Amsterdam, 1989.
- [145] Islam, M.; Al-Amin, M.; Siddiqi, M. M. A.; Akter, S.; Haque, M. M.; Sultana, N.; Chowdhury, A. S. Isolation of quercetin-3-o-beta-d-glucopyranoside from the leaves of *Azadirachta indica* and antimicrobial and cytotoxic screening of the crude extracts. *Dhaka Univ. J. Sci.* **2012**, 60, 11-14.
- [146] Pereira, C.; Barreto-Júnior, C. B.; Kuster, R. M.; Simas, N. K.; Sakuragui, C. M.; Porzel, A.; Wessjohann, L. Flavonoids and a neolignan glucoside from *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Quim. Nova* **2012**, 35, 1123-1126.
- [147] Wang, J.; Gao, H.; Zhao, J.; Wang, Q.; Zhou, L.; Han, J.; Yu, Z.; Yang, F. Preparative separation of phenolic compounds from *Halimodendron halodendron* by high-speed counter-current chromatography. *Molecules* **2010**, 15, 5998-6007.
- [148] Lee, E. H.; Kim, H. J.; Song, Y. S.; Jin, C.; Lee, K-T.; Cho, J.; Lee, Y. S. Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Arch. Pharm. Res.* **2003**, 26, 1018-1023.
- [149] Jung, M.; Park, M. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules* **2007**, 12, 2130-2139.
- [150] Correa-Hernández, S. X.; Puebla-Ibáñez, P.; de la Calle, R. C.; Martín-Calvo, M. L.; del Barrio, L. S. R.; Pabón, M. F. G. Vasodilator profile of flavonoid and phenylbutanoid compounds isolated from *Croton schiedeianus* Schlecht. *Rev. Fac. Med.* **2008**, 56, 291-301.
- [151] Santos, H. S.; Furtado, E.; Rodrigues, A. S.; Bandeira, P. N.; Lemos, T. L. G.; Bezerra, A. M. C.; Braz-Filho, R. Chemical composition and antioxidant activity of chemical constituents from *Croton zehntneri* (Euphorbiaceae). *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2017**, 6, 1146-1149.

- [152] Novello, C. R.; Marques, L. C.; Pires, M. E.; Kutschenco, A. P.; Nakamura, C. V.; Nocchi, S.; Sarragiotto, M. H.; Mello, J. C. P. Bioactive indole alkaloids from *Croton echinoides*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, 27, 2203-2209.
- [153] Carini, J. P.; Klamt, F.; Bassani, V. L. Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy. *RSC Adv.* **2014**, 4, 3131-3144.
- [154] Schwingel, L. C.; Schwingel, G. O.; Storch, N.; Barreto, F.; Bassani, V. L. 3-*o*-methylquercetin from organic *Nicotiana tabacum* L. trichomes: Influence of the variety, cultivation and extraction parameters. *Ind. Crops Prod.* **2014**, 55, 56-62.
- [155] Mesquita, M. L. de; Paula, J. E.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; Grougnet, R.; Michel, S.; Tillequin, F.; Espindola, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, 123, 439-445.
- [156] O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 5421-5426.
- [157] Martins, M. D.; Maeques, M. M.; Bussadori, S. K.; Mesquita-Ferrari, R. A. Pavesi, V. C. S.; Waladt, N. S.; Fernandes, K. P. Citotoxicidade *in vitro* de extratos arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). *Rev. ConScientiae Saúde* **2009**, 8, 99-104.
- [158] Ribeiro, S. S.; Jesus, A. M.; Anjos, C. S.; Silva, T. B.; Santos, A. D. C.; Jesus, J. R.; Andrade, M. S.; Sampaio, T. S.; Gomes, W. F.; Alves, P. B.; Carvalho A. A.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Pinheiro, M. L. B.; Prata, A. P. N.; Blank, A. F.; Silva-Mann, R.; Moraes, V. R. S.; Costa, E. V.; Nogueira, P. C. L.; Bezerra, D. P. Evaluation of the cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. *Planta Med.* **2012**, 78, 1601-1606.

[159] Vinutha, B.; Prashanth, D.; Salma, K.; Sreeja, S. L.; Pratiti, D.; Padmaja, R.; Radhika, S.; Amit, A.; Venkateshwarlu, K.; Deepak, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol.* **2007**, 109, 359-363.